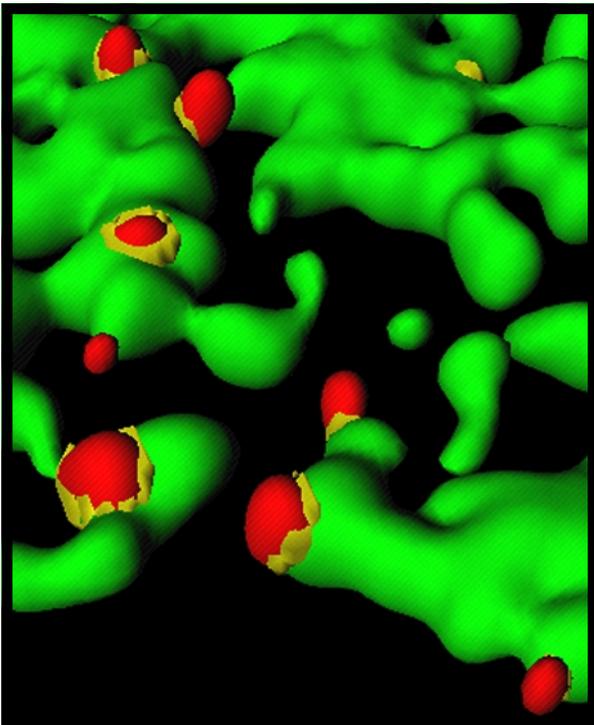


**Die Vesikel des Poliovirus-Replikationskomplex entstehen
an den Membranen des endoplasmatischen Retikulums
unter Verwendung der zellulären COPII-Proteine**



René C. Rust

*Inauguraldissertation zu Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -
des Fachbereichs Biologie, Chemie und Geowissenschaften (FB08)
der Justus-Liebig-Universität Gießen*

*vorgelegt von
René Christian Rust
Diplom-Biologe
aus Princeton / NJ, USA*

Gießen, Dezember 2001

D26

<i>Dekan:</i>	<i>Prof. Dr. Jürgen Janek</i>
<i>1. Gutachter:</i>	<i>Prof. Dr. Erich Schwartz</i>
<i>2. Gutachter:</i>	<i>Prof. Dr. Kurt Bienz</i>

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2001



Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 1999 bis Dezember 2001 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kurt Bienz am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Basel (Schweiz) angefertigt.

Diese Dissertation wurde durch folgende Organisationen gefördert: Gottlieb Daimler- und Karl Benz-Stiftung (Ladenburg), Freiwillige Akademische Gesellschaft (Basel, Schweiz), Schweizerischer Nationalfonds, Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Basel.

Teile dieser Arbeit wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Rust, R. C., L. Landmann, R. Gosert, B. L. Tang, W. Hong, H.-P. Hauri, D. Egger, and K. Bienz. 2001. „Cellular COPII proteins are involved in the production of vesicles forming the poliovirus replication complex.“

Journal of Virology, Vol. 75: Seiten 9808-9818

Herrn Prof. Dr. Kurt Bienz danke ich für die Überlassung dieses äußerst interessanten Themas, für die vielen Gelegenheiten zur Diskussion und die Möglichkeiten diese Arbeit stetig zu verbessern.

Herrn Prof. Dr. Erich Schwartz danke ich für seine Unterstützung und die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit am Fachbereich 08 der Universität Gießen.

Herrn Prof. Dr. Lukas Landmann danke ich für die Hilfe am konfokalen Mikroskop und bei der Bildbearbeitung, besonders für die Erduldung der überfüllten Festplatten.

Den Kollegen im Stachelschützenhaus zu Basel, besonders denen in Daniel Bernoulli's physikalischem Kabinet, Denise Egger, Rainer Gosert, Elisa Lepori, Ingrid Danielsen und Andrea Glaser danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Den Dres. Elli Ehrenfeld, Hans-Peter Hauri, Wanjin Hong, David Meyer, Achim Schott, Bor Luen Tang und Natalya Teterina danke ich für die großzügige Überlassung von Antikörpern und Plasmiden sowie für die interessanten und hilfreichen Diskussion.

Mein besonderer Dank gilt meiner Mutter, meiner Schwester und Ina, deren Unterstützung immer eine große Hilfe war. Meinen Freunden und Kollegen danke ich für die Aufmunterungen und gelegentlichen Ablenkungen von der Arbeit.

Inhaltsverzeichnis	Seite
Danksagung	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungen und Definitionen	VI
Abbildungsverzeichnis	X
Zusammenfassung	XIII
Summary	XIV
1. Einleitung	1
1.1. Die Poliomyelitis	2
1.2. Das Poliovirus, der Prototyp der Picornaviridae	5
Morphologie des Poliovirus	7
Genomorganisation des Poliovirus	8
1.3. Infektionszyklus des Poliovirus	10
Translation	12
RNA-Replikation	14
1.4. Virus-induzierte Membranveränderungen	16
1.5. Das Poliovirus-Protein 2BC	21
Das Poliovirus-Protein 2B	22
Das Poliovirus-Protein 2C	22
1.6. Der intrazelluläre Transport	24
Anterograder Transport	27
Retrograder Transport	32
1.7. Zielsetzung der Arbeit	34
2. Material und Methoden	36
2.1. Zellkultur	36
Verwendete Zelllinien	36
Kultivierung der Zellen	36
Aufbewahrung der Zellen in flüssigem Stickstoff	37
Medien für die Zellkultur	37
2.2. Infektion und Transfektion	37
Verwendete Virusstämme	37
Infektion der Zellkulturen mit Poliovirus	38
Transfektion durch Lipofectin	38
Transfektion durch Lipofectin und Infektion des Vaccinia-Virus vTF7-3	39
Transfizierte Plasmide	39

2.3.	Bestimmung der Kinetik der viralen Proteinsynthese	40
2.4.	Immunfluoreszenz	41
	Fixierung der Zellen	41
	Durchführung der Immunfluoreszenz	42
	Eindecken der Präparate für die Fluoreszenzmikroskopie	42
	Eindecken der Präparate für die konfokale Mikroskopie	42
2.5.	Antikörper und Marker zur Detektion zellulärer und viraler Strukturen	43
2.6.	Untersuchung von Kolokalisation im konfokalen Mikroskop	44
	Konfokale Mikroskopie und Dekonvolution	46
	Berechnung der „Point Spread Function“ (PSF)	48
	Durchführung der Dekonvolution	50
	Aufnahme der Bildstapel im CLSM	51
	Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz und des Durchblutens	51
	Darstellungsmöglichkeiten dekonvolvierter Bildserien des CLSM	54
	Bestimmung der Kolokalisation	55
2.7.	Elektronenmikroskopie	56
	Einbettung in Epon-Epoxidharz	57
	Einbettung in LR Gold-Acrylharz	57
	Immuncytochemie	58
	Präparation von Trägernetzen und Kontrastierlösungen für die Elektronenmikroskopie	59
2.8.	Material	59
	Mikroskope und Bildverarbeitung	59
	Reagenzien und Substanzen	60
3.	Ergebnisse	63
3.1.	Auswahl der Zelllinie und des Virusstamms für die Immunfluoreszenz	63
3.2.	Synchronisierung der Infektion von Poliovirus Sabin1 in BT7-H Zellen	65
3.3.	Zeitverlauf der Infektion von Poliovirus Sabin1 in BT7-H Zellen	66
	Untersuchung des Verlaufs der Poliovirus-Infektion im Elektronenmikroskop	66
	Untersuchung des Verlaufs der Poliovirus-Infektion durch Immunfluoreszenz-Analysen	71
	Kinetik der Proteinsynthese von Poliovirus Sabin1 in BT7-H Zellen	74
3.4.	Vergleich der Morphologie der Poliovirus-Vesikel verschiedener Wirtszellen und Poliovirus-Stämme im Elektronenmikroskop	76
3.5.	Auswahl der zellulären Marker für die Untersuchung von Kolokalisation in der Immunfluoreszenz	78
	Auswahl der Marker für das endoplasmatische Retikulum	79

Das Protein 2A des Pflanzenvirus GFLV als potentieller ER-Marker	81
Auswahl der Marker für den Golgi-Apparat	83
3.6. Untersuchung des Ursprungs der Poliovirus-Vesikel in infizierten Zellen mittels Immunfluoreszenz	84
Untersuchung des ER in Poliovirus-infizierten Zellen mittels konventioneller Fluoreszenzmikroskopie	85
Untersuchung des ER und der Poliovirus-Vesikel im konfokalen Mikroskop	86
3.7. Darstellung der Poliovirus-Vesikel und des ER durch konfokale Mikroskopie, Dekonvolution und 3D-Rekonstruktion.	87
Darstellung der Kolokalisation des ER-Markers p63 mit dem Marker der Poliovirus-Vesikel durch 3D-Rekonstruktion	87
Darstellung der Kolokalisation des ER-Markers MERG mit dem Marker der Poliovirus-Vesikel durch 3D-Rekonstruktion	97
Vergleich der Poliovirus-Vesikel in der 3D-Rekonstruktion mit der Elektronenmikroskopie	98
3.8. Darstellung der Poliovirus-Vesikel und des Golgi-Apparates durch konfokale Mikroskopie, Dekonvolution und 3D-Rekonstruktion	100
3.9. Untersuchung anterograder Transportvesikel in uninfizierten und Poliovirus-infizierten Zellen	103
Darstellung anterograder Transportvesikel in uninfizierten Zellen	103
Darstellung anterograder Transportvesikel in Poliovirus-infizierten Zellen	105
Untersuchung der Kolokalisation der COPII-Bestandteile Sec13 und Sec31 in uninfizierten Zellen	105
3.10. Untersuchung der Kolokalisation von COPII-Bestandteilen mit dem Marker für die Poliovirus-Vesikel in infizierten Zellen	107
3.11. Vergleich der Verteilung der anterograden Transportvesikel in uninfizierten Zellen mit der Verteilung der Poliovirus-Vesikel in infizierten Zellen	110
3.12. Untersuchung der Poliovirus-Vesikel nach Expression aller Poliovirus-Nichtstrukturproteine in BT7-H Zellen	111
3.13. Untersuchung der Poliovirus-Vesikel nach Expression des Poliovirus-Proteins 2BC in BT7-H Zellen	113
3.14. Weiterführende Charakterisierung der Poliovirus-Vesikel	116
Untersuchung der Kolokalisation eines COPI-Markers mit dem Marker für die Poliovirus-Vesikel in infizierten BT7-H Zellen	116
Untersuchung der Kolokalisation des „ER exit site“- Markers YIP1a mit dem Marker der Poliovirus-Vesikel in infizierten Zellen	117
Veränderungen des Cytoskeletts in Poliovirus-infizierten Zellen	121
Untersuchung der Wirkung von H89 auf die Bildung der Poliovirus-Vesikel	123
Untersuchung der Wirkung von H89 in uninfizierten Zellen	124

Untersuchung der Wirkung von H89 in Poliovirus-infizierten Zellen im konfokalen Mikroskop	124
Untersuchung der Wirkung von H89 in Poliovirus-infizierten Zellen im Elektronenmikroskop	128
Markierung Poliovirus-infizierter Zellen mit anti ERGIC53- und anti rbet1-Antikörpern	130
4. Diskussion	135
4.1. Etablierung des experimentellen Systems zur Untersuchung der Bildung der Poliovirus-Vesikel	135
Auswahl der Marker für die Untersuchung von Kolo-kalisation in der Immunfluoreszenz	139
Etablierung und Validierung der konfokalen Mikroskopie, Dekonvolution und 3D-Rekonstruktion	143
4.2. Poliovirus-Vesikel werden durch den zellulären COPII-Mechanismus an den Membranen des ER gebildet	148
Texturänderung des ER in der Poliovirus-Infektion	148
Die Ergebnisse der 3D-Rekonstruktion konfokalmikroskopischer Bildserien erklären die Herkunft und Bildung der Poliovirus-Vesikel	149
Die Kolo-kalisation der COPII-Proteine mit dem Protein 2B zeigt, daß die Poliovirus-Vesikel durch den zellulären COPII-Mechanismus gebildet werden	150
Die Morphologie der Poliovirus-Vesikel	151
Die Morphologie der zellulären COPII-Vesikel	155
4.3. Ausschluß von ER-Membranproteinen aus anterograden Transportvesikeln und Poliovirus-Vesikeln	157
4.4. Ist der zelluläre COPII-Coat auf den Membranen der Poliovirus-Vesikel vollständig und funktionell?	160
4.5. Mögliche Funktionen des viralen Proteins 2BC bei der Bildung der Poliovirus-Vesikel	163
4.6. Mögliche Ursachen für die Akkumulation der Poliovirus-Vesikel	169
4.7. Einfluß der Poliovirus-Infektion auf den zellulären Transport	172
Wirkung von Brefeldin A auf die Bildung der Poliovirus-Vesikel und die virale RNA-Replikation.	174
Effekte von Oleinsäure und Cerulenin auf die Replikation des Poliovirus	177
4.8. Die Prozesse der Translation, der Bildung der Vesikel und die Bildung des Replikationskomplex des Poliovirus finden an den gleichen zellulären Membranen statt	177
4.9. Modell der Entstehung des membrangebundenen Poliovirus-Replikationskomplex	179
5. Literatur	181
curriculum vitae	194
Publikationen	195

Abkürzungen und Definitionen

AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
Ci	Curie, Einheit radioaktiver Strahlung
CLSM	„confocal laser scanning microscope“ oder konfokales Mikroskop; Lichtmikroskop, das durch eine Lochblende die Aufnahme einzelner optischer Schnittebenen und optischer Schnittserien verschiedener Ebenen eines Präparates ermöglicht, meist bei Immunfluoreszenzanalysen angewandt
Cluster	Ansammlung von Vesikeln im Cytoplasma von Poliovirus-infizierten Zellen
Codon	Nukleotidtriplett, codiert innerhalb des richtigen Leserasters eine Aminosäure
COPI	„coat protein complex I“, Proteinkomplex, der die Bildung retrograder Transportvesikel durchführt
COPII	„coat protein complex II“, Proteinkomplex, der die Bildung anterograder Transportvesikel durchführt
CPE	„cytopathic effect“, cytopathischer Effekt = Auftreten pathologischer Veränderungen von Zellen, die durch eine Virus-Infektion ausgelöst werden
DABCO	1,4-Diazobicyclo(2.2.2)-Oktan, Substanz, die das Ausbleichen von Fluorochromen inhibiert („anti-Fading“-Reagenz), wird dem Eindeckmittel für Immunfluoreszenzanalysen zugegeben
Dekonvolution	mathematische Methode, um durch eine Abbildungsfunktion eines optischen Systems (z.B. CLSM) dessen Aberationen zu bestimmen und zu eliminieren Resultiert in einer Verbesserung des Verhältnisses von Signal zu Hintergrund und damit in einer Verbesserung der Auflösung des optischen Systems.
DMEM	„Dulbecco’s modified Eagle’s Medium“, Medium für die Zellkultur
DNA	„desoxyribonucleic acid“, Desoxyribonukleinsäure
3D	dreidimensional
EM	Elektronenmikroskop
EMCV	Encephalomyocarditisvirus
ER	endoplasmatisches Retikulum, erstes Organell der Zelle im anterograden Transport, Netzwerk aus Membranen, das über das gesamte Zytoplasma der Zellen verteilt ist, Ort der Synthese und Faltung sowie der ersten Post-translationalen Modifikationen aller sekretorischen und membrangebundenen Proteine

ERES	„ER exit sites“, Bereiche der ER-Membranen, an denen die Bildung der anterograden Transportvesikel durch den COPII-Coat stattfindet
ERGIC	„ER-Golgi intermediate compartment“, distinktes, membranumhülltes Zell-Kompartiment, auf dem anterograden Transportweg zwischen ER und Golgi liegt und mit dem die anterograden Transportvesikel fusionieren, Funktionen bisher unbekannt
et al.	„et alii“, und andere
FITC	Fluorescein Isothiocyanat, Fluorochrom mit einem Emissionsmaximum von 488 nm
FMDV	„Foot- and mouth-disease virus“, Maul- und Klauenseuche Virus
GAM	„goat anti mouse“, in Ziegen produzierter Antikörper gegen Epitope von Maus-Antikörpern, als Konjugat eingesetzt zur Fluoreszenzmarkierung primärer Antikörper
GAR	„goat anti rabbit“, in Ziegen produzierter Antikörper gegen Epitope von Kaninchen-Antikörpern, als Konjugat eingesetzt zur Fluoreszenzmarkierung primärer Antikörper
GMP-PNP	Guanylyl-Imidodiphosphat (Tetralithium-Salz), nicht hydrolysierbares GTP-Analog, wird verwendet um GTPasen (wie z.B. Sar1) zu inhibieren
GTP	Guanosintriphosphat
h	„hour“, Stunde
hpi	„hours post infection“, Stunden nach Infektion
IF	Immunfluoreszenz, Methode zum Nachweis von Proteinen durch fluoreszierend markierte Antikörper
Imaris	Eingetragenes Warenzeichen der Bitplane AG, Zürich, Schweiz. Software zur Bildverarbeitung und Dekonvolution, Module: Huygens, Colocalisation, Isosurface
IRES	„Internal ribosome entry site“, Interne Ribosomen Eintrittsstelle, RNA-Segment, das bei Picornaviren entdeckt wurde und eine interne Translationsinitiation unabhängig vom 5'-Ende der RNA ermöglicht
Isosurface	Darstellungsweise von 3D-Rekonstruktionen, bei denen der Schwellenwert einer Fluoreszenzintensität als Grenze der assoziierten Struktur dargestellt wird, eingetragenes Warenzeichen der Firma Bitplane AG, Zürich, Schweiz
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Konjugat	sekundärer Antikörper, an den ein Fluorochrom oder eine andere nachweisbare Gruppe gekoppelt („konjugiert“) ist, dient zum Nachweis primärer Antikörper in der Immuncytochemie

LM	Lichtmikroskop
m	milli-
μ	mikro-
min	Minute
MIP	„maximal intensity projection“, Darstellungsart eines Bildstapels aufeinanderfolgender Z-Schnitte aus dem Konfokal-Mikroskop, alle Bilder werden übereinander projiziert und zweidimensional abgebildet, dabei wird die stärkste Fluoreszenz als höchste Intensität dargestellt
mkA	monoklonaler Antikörper
MLE	„maximum likelihood estimation“, Algorithmus der Dekonvolution, der sich besonders für die mittel bis hoch verrauschten Bilder des CLSM eignet
mock Infektion	Kontrolle einer Infektion, bei der das Protokoll der Infektion durchgeführt wird, ohne das infektiöse Agens zuzugeben
MOI	„multiplicity of infection“, Anzahl der Viren, die pro Zelle zu einer experimentellen Infektion eingesetzt wird
n	nano-
NPG	N-Propyl-Gallat, Substanz, die das Ausbleichen von Fluorochromen inhibiert („anti-Fading“-Reagenz), wird dem Eindeckmittel für Immunfluoreszenzanalysen zugegeben
nt	Nukleotid
NTP	Nukleotidtriphosphat
NTR	Nicht-translatierte Region; an beiden Enden des RNA-Genoms der Picornaviren (3'- und 5'-Ende), enthalten Sequenzen, die die Translation und Replikation regulieren
ORF	„open reading frame“, offener Leseraster, DNA-oder RNA-Sequenz zwischen einem Start- und einem Stop-Codon
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerase Kettenreaktion
Pellet	Sediment nach Zentrifugation
PFU	„plaque forming units“ ² , im Plaque-Test bestimmte Anzahl der infektiösen (also auf einer Zellkultur Plaques induzierenden) Viren pro ml der Suspension
Pixel	digitaler Bildpunkt in zwei Dimensionen
pkS	polyklonales Serum
Precursor	Vorläufer der reifen Poliovirus-Proteine vor der endgültigen proteolytischen Prozessierung, haben biologische Funktionen
Promotor	DNA-Erkennungssequenz für eine RNA-Polymerase

PSF	„point spread function“, mathematische Funktion, die die Projektion eines realen punktförmigen Objekts in dem korrespondierende mikroskopischen Bild beschreibt, wird in der Dekonvolution verwendet um von einem Bild auf die reale Struktur zurückzurechnen
PV	Poliovirus
RNA	„ribonucleic acid“, Ribonukleinsäure
SNARE	„soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor“, Proteine, die sich auf den Membranen von Transportvesikeln (vSNAREs) und von Zielorganellen dieser (tSNAREs) befinden und für die Fusion der Vesikel mit dem richtigen Zielorganell verantwortlich sind
sec	Sekunde
stem loop	„Haarnadelstruktur“, Sekundärstruktur der RNA, die aus einem doppelsträngigen Teil (stem) und einem einzelsträngigen Teil (loop) besteht, hat regulatorische Funktionen bei Translation und Replikation der RNA, z.B in der IRES
Transfektion	Einschleusen und Exprimieren fremder DNA oder RNA in kompetente Zellen
T7	Bakteriophage T7, dessen RNA-Polymerase für die Expression fremder Gene in transfizierten Zellen verwendet wird
T7-Polymerase	DNA-abhängige RNA-Polymerase, die alle Gene transkribiert, die unter der Kontrolle eines T7-Promotors stehen
UV	Ultraviolettes Licht
Voxel	digitaler Bildpunkt in drei Dimensionen, entspr. einem Pixel mit einer Ausdehnung in der Z-Achse
VPg	„Virus protein, genome-linked“, kleines Protein, das kovalent an das 5'-Ende des RNA-Genoms der Picornaviren gebunden ist
VTCs	„vesicular tubular clusters“, Kompartiment des frühen anterograden Transports, bisher ist ungeklärt, ob die VTCs aus fusionierenden COPII-Vesikeln gebildet werden oder ein eigenständiges Transportintermediat darstellen, Überschneidungen mit dem Begriff „ERGIC“
vTF7-3	rekombinantes Vaccinia-Virus, das die T7-Polymerase codiert, eingesetzt zur Expression einzelner Proteine in eukaryotischen Zellen
v/v	Volumen-/Volumen-Verhältnis
w/v	Gewichts-/Volumen-Verhältnis
z. B.	zum Beispiel
Z-Schnitte	einzelne optische Schnitte des Konfokal-Mikroskops, sind aufeinanderfolgend und bilden einen Bildstapel, der dekonvoluiert werden kann.

Abbildungsverzeichnis

1. Einleitung	Seite
Abb. 1: <i>Darstellung eines Priesters im antiken Ägypten ca. 1500 Jahre vor Christus, der Symptome der Poliomyelitis aufweist.</i>	2
Abb. 2: <i>Aufruf zur oralen Polioimpfung durch die York County Medical Society 1963.</i>	3
Abb. 3: <i>Fortschritte bei der globalen Eradikation der Poliomyelitis von 1988 bis 1998.</i>	4
Tab. 1: <i>Systematik der Picornaviren.</i>	6
Abb. 4: <i>Aufbau des Poliovirus Kapsids.</i>	8
Abb. 5: <i>Genomorganisation des Poliovirus.</i>	9
Abb. 6: <i>Infektionszyklus des Poliovirus.</i>	11
Abb. 7: <i>Mechanismus der RNA Replikation des Poliovirus.</i>	14
Abb. 8: <i>Membranveränderungen in Poliovirus-infizierten Zellen.</i>	18
Abb. 9: <i>Elektronenmikroskopische Aufnahme eines von Poliovirus-Vesikeln umgebenen Replikationskomplex.</i>	20
Abb. 10: <i>Schema des zellulären sekretorischen Transportwegs.</i>	25
Tab. 2: <i>Bestandteile des zellulären COPII-Coat.</i>	28
Abb. 11: <i>Schema der Bildung der anterograden Transportvesikel.</i>	29
2. Material und Methoden	
Tab. 3: <i>Primäre Antikörper für die Immunfluoreszenz.</i>	43
Tab. 4: <i>Sekundäre Antikörper / Konjugate für die Immunfluoreszenz.</i>	45
Tab. 5: <i>Weitere Marker zur Fluoreszenzdetektion von Zellorganellen.</i>	46
Abb. 12: <i>Aufbau und Strahlengang eines konfokalen Mikroskops (CLSM).</i>	47
Abb. 13: <i>Point Spread Function (PSF) und Reduktion der Abbildungsfehler des CLSM durch Dekonvolution.</i>	49
Abb. 14: <i>Untersuchung des Durchblutens der verwendeten Fluorochrome und Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz dekonvolvierter Bildserien des CLSM.</i>	52
3. Ergebnisse	
Abb. 15: <i>Expression des Poliovirusrezeptors CD155 von BT7-H Zellen.</i>	65
Abb. 16: <i>Verlauf der Poliovirus-Infektion in BT7-H Zellen im Elektronenmikroskop - Übersicht.</i>	67
Abb. 17: <i>Verlauf der Poliovirus-Infektion in BT7-H Zellen im Elektronenmikroskop - Details.</i>	70
Abb. 18: <i>Verlauf der Poliovirus-Infektion in BT7-H Zellen in der Immunfluoreszenz mit dem Marker für die Poliovirus-Vesikel.</i>	72
Abb. 19: <i>Inhibition der Translation von Poliovirus Sabin1 durch erhöhte NaCl-Konzentration.</i>	74

Abb. 20: Kinetik der Proteinsynthese von Poliovirus Sabin1-infizierten BT7-H Zellen.	76
Abb. 21: Die Morphologie der Poliovirus-Vesikel ist abhängig von der Wirtszelle.	77
Abb. 22: Die ER-Marker p63 und MERG in der Immunfluoreszenz.	79
Abb. 23: Weitere ER-Marker in der Immunfluoreszenz.	80
Abb. 24: Das 2A-Protein des GFLV ist als ER-Marker ungeeignet.	82
Abb. 25: Der Golgi-Marker Giantin in der Immunfluoreszenz.	84
Abb. 26: Texturänderung des ER in Poliovirus-infizierten Zellen.	85
Abb. 27: Darstellung der Poliovirus-Vesikel und des ER in Bildstapeln der konfokalen Mikroskopie.	88
Abb. 28: Darstellung der Kolokalisation der Marker für die Poliovirus-Vesikel und das ER in MIP und X-Y-Z-Projektion.	91
Abb. 29: Einzelne optische Schnitte und Histogramme zeigen die Verteilung der Marker für das ER und die Poliovirus-Vesikel in der infizierten Zelle.	93
Abb. 30: 3D-Rekonstruktion Poliovirus-infizierter Zellen; Poliovirus-Vesikel sind an den Membranen des ER lokalisiert, aber die Kolokalisation der Marker ist auf die Kontaktstellen beider Strukturen beschränkt.	96
Abb. 31: 3D-Rekonstruktion Poliovirus-infizierter Zellen; die Kolokalisation der Marker MERG und 2B ist auf die Kontaktstellen des ER und der Poliovirus-Vesikel beschränkt.	98
Abb. 32: Vergleich der Darstellung der Poliovirus-Vesikel im Elektronenmikroskop und und der 3D-Rekonstruktion von CLSM-Bildserien.	99
Abb. 33: Der Golgi-Apparat ist nicht der primäre Entstehungsort der Poliovirus-Vesikel.	101
Abb. 34: Der ER-Membranmarker p63 wird aus den Membranen der anterograden Transportvesikel in uninfizierten und in Poliovirus-infizierten Zellen ausgeschlossen.	104
Abb. 35: Die COPII-Bestandteile Sec13 und Sec31 kolokalisieren auf den Vesikeln des anterograden Transports.	106
Abb. 36: Poliovirus-Vesikel tragen beide COPII-Bestandteile Sec13 und Sec31.	108
Abb. 37: Poliovirus-Vesikel sind bereits früh in der Infektion in Clusters lokalisiert.	110
Abb. 38: Virale Replikation ist keine Voraussetzung für die Bildung der Poliovirus-Vesikel.	112
Abb. 39: Durch die Expression des PV-Proteins 2BC werden PV-Vesikel durch den zellulären COPII-Mechanismus gebildet.	114
Abb. 40: Der Marker für die retrograden Transportvesikel, anti EAGE, zeigt nicht die beschriebene Markierung in BT7-H Zellen.	116
Abb. 41: Markierung der ER exit sites mit dem Marker YIP1. Uninfizierte BT7-H Zellen wurden mit dem Antikörper gegen das ER exit site Protein YIP1 und dem Konjugat Cy2 markiert.	117
Abb. 42: Poliovirus-Vesikel zeigen weniger Kolokalisation mit dem ER exit site-Marker YIP1, als die Vesikel des anterograden Transports.	119

<i>Abb. 43: Veränderungen des Cytoskeletts in der Poliovirus-Infektion.</i>	122
<i>Abb. 44: Inhibierung der Bildung von COPII-Vesikeln durch H89.</i>	125
<i>Abb. 45: Inhibierung der Bildung der Poliovirus-Vesikel durch H89.</i>	127
<i>Abb. 46: Inhibierung der Bildung der Poliovirus-Vesikel durch H89- Untersuchung in der Elektronenmikroskopie.</i>	129
<i>Abb. 47: Der Marker für die Poliovirus-Vesikel kolokalisiert nicht mit ERGIC53.</i>	132
<i>Abb. 48: Der Antikörper gegen das vSNARE rbet1 zeigt nicht die beschriebene Markierung in BT7-H Zellen.</i>	133

Zusammenfassung

Poliovirus gehört zur Familie der Picornaviridae, die unbehüllte animal- und humanpathogenen Viren umfasst, die ein einzelsträngiges RNA-Genom positiver Polarität besitzen. Die RNA-Replikation des Poliovirus findet, wie bei allen Plus-Strang RNA-Viren, in einem membrangebundenen Replikationskomplex statt. Dabei wird durch die virale RNA-Polymerase eine, zum viralen Genom komplementäre, Minus-Strang-RNA synthetisiert, die als Matrize für die Synthese neuer Virus-Genome dient. Die Voraussetzung für den Aufbau des Poliovirus-Replikationskomplex ist die Bildung von Vesikeln im Cytoplasma infizierter Zellen, an deren Membranen die Replikation der viralen RNA initiiert wird. Die Cytopathologie der Poliovirus-Infektion entsteht durch die Akkumulation dieser Poliovirus-Vesikel und ist daher mit der viralen RNA-Replikation gekoppelt.

Zur Untersuchung des Ursprungs der Poliovirus-Vesikel und des Mechanismus ihrer Bildung zu den frühen Zeitpunkten der Poliovirus-Infektion wurden in dieser Arbeit sowohl Elektronenmikroskopie, als auch Immunfluoreszenz-Untersuchungen eingesetzt. Dabei wurden Affennierenzellen (BT7-H) untersucht, die entweder uninfiziert, mit Poliovirus infiziert, oder mit Plasmiden transfiziert waren, die für bestimmte Poliovirus-Nichtstrukturproteine codierten. Markerproteine für zelluläre und virale Membranen wurden durch die Analyse optischer Schnittserien im konfokalen Mikroskop lokalisiert. Die Auflösung der konfokalmikroskopischen Aufnahmen wurde durch eine computer-gestützte Methode zur Bildrestaurierung (Dekonvolution) erhöht, mit der die Abbildungsfehler des Mikroskops und die Hintergrundfluoreszenz reduziert werden konnten. Die Dekonvolution ermöglichte es, 3D-Rekonstruktionen von den markierten Strukturen der Zellen zu erstellen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Bildung der Poliovirus-Vesikel sich morphologisch nicht von den zellulären anterograden Transportvesikeln unterscheidet, die durch die COPII-Proteine an den Membranen des endoplasmatischen Retikulums (ER) gebildet werden. Der Marker für die Poliovirus-Vesikel kolokalisierte mit den beiden COPII-Komponenten Sec13 und Sec31 auf den Membranen der Poliovirus-Vesikel. Dies demonstriert, daß die Poliovirus-Vesikel ebenfalls durch den zellulären COPII-Coat an den Membranen des ER gebildet werden. Der für die anterograden Transportvesikel beschriebene Ausschluß der ER-Membranproteine findet auch bei der Bildung der Poliovirus-Vesikel statt. Es konnte weiter gezeigt werden, daß Poliovirus-Vesikel, die durch die Expression des viralen Proteins 2BC oder aller viralen Nichtstrukturproteine im Cytoplasma akkumulierten, ebenfalls COPII-Proteine trugen, also wie die Vesikel in der Poliovirus-Infektion, durch den COPII-Mechanismus gebildet wurden.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Poliovirus-Vesikel an den Membranen des ER homolog zu den anterograden Transportvesikeln durch den zellulären COPII-Mechanismus gebildet werden und nicht durch die Funktion eines viralen Proteins.

Summary

Poliovirus belongs to the family of Picornaviridae, that consists of non enveloped animal and human pathogenic viruses, that have a single stranded RNA genome of plus polarity. The RNA replication of Poliovirus, as for all plus strand RNA viruses, takes place in a membrane-bound replication complex. During the RNA replication, the viral RNA polymerase synthesizes an RNA strand of minus polarity, which serves as template for the synthesis of new viral plus strand RNAs. The prerequisite for the formation of the Poliovirus replication complex is the production of vesicles in the cytoplasm of the infected cell that are necessary for the initiation of the viral RNA replication. The cytopathology of the Poliovirus infection emerges concomitantly with the accumulation of these Poliovirus vesicles and thus is coupled to viral RNA replication.

To elucidate the origin of the Poliovirus vesicles and the mechanism of their formation, electron microscopy and immunofluorescence assays were applied to African green monkey kidney cells (BT7-H) that were either not infected, infected with Poliovirus, or transfected with plasmids coding for different poliovirus non structural proteins. The localisation of cellular and viral marker proteins was determined by the acquisition of series of consecutive optical sections with a confocal microscope. The resolution of the confocal images was enhanced by a software-based method for image restoration that reduces optical aberrations of the microscope and background fluorescence. This deconvolution procedure allows for a 3D reconstruction of the labeled cells in the specimen.

In this study, it was shown that the formation of Poliovirus vesicles was - on morphological grounds- similar to the cellular vesicles of the anterograde transport, that were formed at the membranes of the endoplasmic reticulum (ER). The marker for the Poliovirus vesicles colocalised with both COPII-components Sec13 and Sec31 on the membranes of the Poliovirus vesicles. This shows, that Poliovirus vesicles are formed at the ER membranes by the same mechanism utilizing the cellular COPII coat. The exclusion of ER membrane proteins, that was previously reported for the vesicles of the cellular anterograde transport, was shown to occur with the formation of the Poliovirus vesicles also. Furthermore, it was shown that Poliovirus vesicles that accumulated after either the expression of PV protein 2BC or the entire set of the viral non structural proteins, were also carrying the COPII coat proteins and thus were produced by the COPII mechanism like the vesicles during the poliovirus infection.

These results demonstrate that Poliovirus vesicles are formed at the ER membranes by the cellular COPII mechanism homologous to the anterograde transport vesicles and not through the function of a single virale protein.

1. Einleitung

Viren sind obligat intrazelluläre Parasiten, die für ihre Vermehrung auf das Milieu von Wirtszellen angewiesen sind. Sie greifen in verschiedene Prozesse der Wirtszelle ein und rekrutieren zelluläre Faktoren für die Vermehrung ihres Genoms. Unbehüllte Viren bestehen lediglich aus Proteinen und Nukleinsäure, weisen keine strukturelle Ähnlichkeit mit Zellen auf und haben weder einen eigenen Stoffwechsel noch einen eigenen Apparat zur Proteinbiosynthese.

Für die Wissenschaft waren Viren als Krankheitserreger lange Zeit ein Mysterium, da sie durch bakteriendichte Filter nicht aus Flüssigkeiten isoliert werden konnten, die eine infektiöse Krankheit auslösen konnten. Dimitri Iwanowski zeigte 1892 erstmals, daß sich der Erreger der Tabak-Mosaik-Erkrankung durch einen bakteriendichten Filter nicht zurückhalten ließ und nicht allein kultivierbar war, sondern zur Vermehrung auf lebende Pflanzenzellen angewiesen ist. Martinus Beijerinck konnte 1898 zeigen, daß der Erreger der Tabak-Mosaik-Krankheit sich selbst reproduzieren konnte und nannte diesen in klarer Abgrenzung zu den damals bekannten infektiösen Agenzien „Contagium Vivum Fluidum“. Ebenfalls 1898 beschrieben Löffler und Frosch das Maul- und Klauenseuche-Virus als erstes animalpathogenes Agens, welches bakteriendichte Filter passieren konnte (Löffler und Frosch, 1964). Damit wurde erstmals ein Agens charakterisiert, das in einem direkten Zusammenhang mit einem sich selbst reproduzierenden, infektiösen Krankheitserreger bei Tieren stand, jedoch morphologisch zunächst nicht darstellbar war. Mit der Entwicklung der Elektronenmikroskopie gelang es erstmals in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts Viren sichtbar zu machen und morphologisch zu charakterisieren. Die Elektronenmikroskopie stellt auch heute eine wirksame Methode zur Untersuchung von Viren und den Interaktionen mit ihren Wirtszellen dar und gewinnt nach der schnellen Entwicklung der molekularbiologischen Methoden in Kombination mit diesen wieder zunehmend an Bedeutung.

Seit der Entdeckung der Viren konnten im Forschungsgebiet der Virologie große Fortschritte erzielt werden, wie z.B. die globale Ausrottung der Pocken in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts und die Bandbreite der heute erhältlichen Vakzine gegen eine Vielzahl viraler Infektionen zeigen. Heute stellt die Virologie ein intensiv bearbeitetes Gebiet der biologischen und medizinischen Forschung dar, besonders aufgrund ihrer Bedeutung für die menschliche Gesundheit und globale Ökonomie. Die große Anzahl HIV-infizierter Menschen und die noch immer häufigen Ausbrüche viraler Infektionen bei Mensch und Tier demonstrieren den Bedarf an virologischer Forschung. Dabei ist durch die Globalisierung und die einhergehende gesteigerte Mobilität der Menschen auch über große Entfernungen, sowie den Handel mit Pflanzen und Tieren zwischen Nationen und Kontinenten die Ausbreitung von Virusinfektionen nicht mehr auf geographisch isolierte Populationen beschränkt. Durch das oftmals enge Zusammenleben von Tieren und Menschen kommt es dabei gelegentlich zum Überschreiten der Speziesgrenzen und damit zu einer Etablierung von Infektionen animaler Viren im Menschen.

Mit dem tiefergehenden Wissen über Viren wurden in jüngster Zeit neue Anwendungen der Virologie erschlossen, wie etwa die Verwendung von Viren als Vektoren in der Gentherapie oder die Untersuchung der Evolution höherer Lebewesen durch die Sequenzierung von ins Wirtsgenom integrierten, viralen Gensequenzen zeigt. Trotz des Wissenszuwachses im Forschungsgebiet der Virologie bestehen auch heute noch Wissenslücken bei den grundlegenden Prozessen der Replikation vieler Viren.

1.1. Die Poliomyelitis

Das Poliovirus ist der Erreger der Poliomyelitis („Kinderlähmung“), deren Symptome schon ca. 1500 Jahre vor Christus im antiken Ägypten bekannt waren (siehe Abb. 1). Im Jahre 1840, also noch bevor Viren entdeckt wurden, publizierte Jacob von Heine seine systematischen Untersuchungen der Poliomyelitis und vermutete als erster, es könne sich dabei um eine übertragbare Krankheit handeln. 1908 wurde von Karl Landsteiner und Erwin Popper erstmals die Hypothese aufgestellt, daß es sich bei dem Erreger der Poliomyelitis um ein Virus handeln könnte.



Abb. 1: Darstellung eines Priesters im antiken Ägypten ca. 1500 Jahre vor Christus, der Symptome der Poliomyelitis aufweist. Das Bild zeigt die für die paralytische Poliomyelitis typische Unterentwicklung der Muskulatur eines Beines des Infizierten.

Das einzig bekannte Reservoir des Poliovirus ist der Mensch, wobei die Übertragung des Virus von einem Menschen auf den nächsten auf fäkal - oralem Weg, seltener über Tröpfcheninfektion geschieht. Zunächst vermehrt sich das Poliovirus in Pharynx und Verdauungstrakt des infizierten Menschen.

Nach der Vermehrung an diesem primären Replikationsort folgt ein Übertritt des Virus in die Blutbahn und damit eine Phase der generalisierten Virämie. Die Mehrheit der Poliovirus-Infektionen endet mit dieser Virämiephase und verläuft daher weitgehend inapparent mit nur leichten, grippeähnlichen Symptomen („Sommergrippe“), die zu keiner weiteren Beeinträchtigung der Gesundheit des Infizierten führen. Dabei wird im Allgemeinen vom Körper eine langanhaltende Immunität gegen das Virus aufgebaut. Nur ca. 0,1 - 0,2% aller Poliovirus-Infektionen verlaufen als apparente Erkrankungen, die durch eine Infektion des Zentralnervensystems hervorgerufen werden. Ein Teil dieser apparenten Erkrankungen manifestiert sich als aseptische Meningitis oder Enzephalitis. Die seltene aber offensichtlichste Form der Poliovirus-Infektion, die paralytische Poliomyelitis, entsteht durch Nekrosen der Ganglienzellen des Zentralnervensystems. Dabei treten charakteristische Läsionen des Rückenmarks auf, die zur Namensgebung der Erkrankung geführt haben (griech. polios = grau; myelos = Rückenmark). Die überwältigende Mehrheit der paralytischen Poliomyelitis (über 80%) tritt in der sogenannten spinalen Form auf, die die Motoneuronen der Spinalganglien betrifft und zur irreversiblen Lähmung (Paralyse) von Teilen der äußeren Skelettmuskulatur führt. In seltenen Fällen umfasst die Paralyse auch die Atemmuskulatur, was für die Mehrzahl der Todesfälle durch Polioinfektionen verantwortlich ist. Die Mortalität bei Poliovirus-Infektionen ist jedoch gering. Patienten, die eine paralytische Poliomyelitis überlebt haben, leiden häufig unter Spätfolgen, die unter dem Namen Post-Polio Syndrom zusammengefasst werden. Dabei handelt es sich meist um eine im Alter zunehmende Paralyse der Extremitäten, deren Ursache jedoch bis heute ungeklärt ist.



Abb. 2: Aufruf zur oralen Polioimpfung durch die York County Medical Society 1963. Nach der Einführung der oralen Poliovakzine in den späten 50er Jahren, wurde in den Industrieländern die schnelle und flächendeckende Immunisierung der Bevölkerung erreicht. Dabei wurden besonders in den USA eine Vielzahl staatlicher und privater Organisationen involviert.

Die Verbreitung des Poliovirus wird begünstigt durch die lange Dauer der Ausscheidung im Stuhl und die große Zahl inapparent Infizierter. Zur Prophylaxe gegen die Poliomyelitis wurden Mitte des letzten Jahrhunderts kurz hintereinander zwei verschiedene Impfungen eingeführt. 1954 wurde von Jonas Salk erstmals eine inaktivierte Poliovakzine publiziert, die aus einer durch Formalin

inaktivierten Mischung der drei Poliovirus Serotypen besteht. Ein attenuierter Lebendimpfstoff wurde 1959 durch Albert Sabin als orale Poliovirus Vakzine (OPV) auf den Markt gebracht und enthielt lebende, aber nicht mehr neurovirulente Polioviren aller drei Typen, die durch mehrfache Passage in Zellkulturen gewonnen wurden (Sabin und Boulger, 1973). Die attenuierten Stämme unterscheiden sich von den Wildtypstämmen durch eine Anzahl von Punktmutationen, die über das gesamte Virusgenom verteilt sind. Die geringen Produktionskosten und die gute Verfügbarkeit der oralen Poliovirus Vakzine führte zusammen mit den Anstrengungen der nationalen Gesundheitsbehörden sowie der World Health Organization (WHO), flächendeckende Impfungen zu realisieren, zu einer schnellen Reduktion der klinischen Fälle der Poliomyelitis (siehe Abb. 2). Obwohl die massenhafte Vakzinierung in den Industrienationen dazu geführt hat, daß diese Länder heute weitgehend frei von Poliomyelitis sind, kommen Poliovirus-Infektionen in einer Reihe von Entwicklungsländern auch heute noch regelmäßig vor. Größere Ausbrüche in den letzten Jahren kamen vor in Angola (1999), Albanien und angrenzenden Staaten (1996), in den Niederlanden (1992, bei einer religiösen Vereinigung, die Impfungen verweigert) sowie in China (1989 und 1990 mit über 5000 registrierten Fällen).

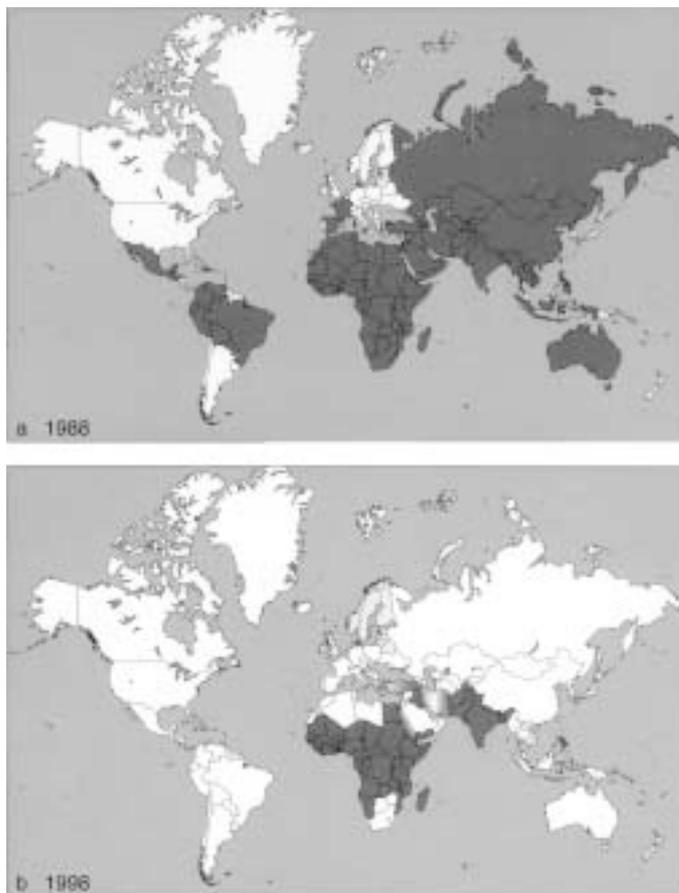


Abb. 3: Fortschritte bei der globalen Eradikation der Poliomyelitis von 1988 bis 1998. Die Karten der Jahre 1988 (a) und 1998 (b) demonstrieren das Auftreten von Wildtypstämmen des Poliovirus (dunkle Bereiche) oder die ungenügende Absicherung der Poliovirus-Diagnostik in den betreffenden Nationen. Im Jahr 1998 war die Zirkulation des Poliovirus in beiden amerikanischen Subkontinenten unterbrochen und die Präsenz des Virus in den westlichen Pazifik-Regionen weitgehend reduziert. Die Gebiete, in denen heute noch Transmissionen von Poliovirus vorkommen, sind hauptsächlich die südlichen Teile Asiens, Westafrika und Zentralafrika. (Bild entnommen aus: Flint et al., Principles of Virology, 2000)

Die WHO hat aus diesem Grund ein Polio-Eradikationsprogramm initiiert, das nach der Eradikation der Pocken in den sechziger Jahren des letzten Jahrhunderts den zweiten Ansatz darstellt, eine Viruserkrankung weltweit auszurotten. Abbildung 3 illustriert den Erfolg bei der Eradikation der Poliomyelitis von 1988 bis 1998. Im Gegensatz zu 1988 war im Jahr 1998 die Übertragung der Poliomyelitis in Südamerika, den westlichen Pazifik-Regionen (mit China) und größtenteils in Europa unterbunden. Die weiterhin bestehenden Endemiegebiete beschränken sich heute auf die westlichen Teile Asiens und Zentralafrikas. Jedoch ist aufgrund des schwankenden Durchimpfungsgrads der Bevölkerung (besonders in Krisengebieten) und dem Auftreten von Quasispezies des Virus (siehe unten) der Erfolg bei der globalen Eradikation trotz mehrmaliger Verschiebung des Zeitplans bisher ausgeblieben.

1.2. Das Poliovirus, der Prototyp der Picornaviridae

Das Poliovirus ist ein Vertreter der Familie der Picornaviridae, deren Charakteristikum neben ihrer geringen Größe (Durchmesser: ca. 30 nm), ein einzelsträngiges und positiv orientiertes, also infektiöses RNA-Genom ist. Aufgrund ihrer geringen Gesamtgröße und dem RNA-Genom wurde der Name dieser Familie ausgehend von „pico“- (griech. „klein“) RNA, geprägt.

Mit den über 250 verschiedenen, bisher bekannten Serotypen stellen die Picornaviridae eine der größten Familien der animal- und humanpathogenen Viren dar. Die Picornaviren gelten als die bestuntersuchte Familie der Viren. Der Grund für den hohen Wissensstand über die Picornaviren ist neben ihrer frühen Entdeckung die Tatsache, daß zu dieser Familie eine Reihe gesundheitlich und ökonomisch bedeutsamer Viren gehören. Neben Poliovirus werden auch die Rhinoviren, die Coxsackieviren, sowie das Hepatitis A-Virus und das Maul- und Klauenseuche-Virus zu dieser Familie gezählt.

Die Picornaviridae wurden vor dem Zeitalter der Genomsequenzierung entsprechend der verschiedenen physikalisch-chemischen Eigenschaften der Virionen in vier Genera eingeteilt, die Enteroviren, die Rhinoviren, die Cardioviren und die Aphthoviren. Die heute übliche Einteilung nach Sequenzvergleichen der viralen Genome hat die Systematik der Picornaviridae zwar nicht substantiell verändert, sie hat jedoch durch die Genauigkeit der Analysen die Zahl der den Picornaviren zugeordneten Isolaten erhöht und damit zum Wissen über die Evolution der Viren beigetragen. So wurde das Hepatitis A-Virus Anfang der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts von den Enteroviren in den neu geschaffenen Genus Hepatovirus gestellt. Inzwischen wurden neue Viren isoliert, die den Picornaviren zugeordnet werden und klassifiziert werden konnten, über die aber bisher keine detaillierten Untersuchungen vorliegen. Weitere Viren, die der Familie Picornaviridae zugerechnet werden, aber noch nicht klassifiziert werden konnten sind z.B. das Duck Hepatitis Virus 1 und 3, das Barramundi Virus oder das Ljungan Virus (7th ICTV Report, 2000).

Genus	bekannte Serotypen	Vertreter
Rhinoviren	100	Humane Rhinoviren
	2	Bovine Rhinoviren
Enteroviren	3	Poliovirus
	23	Coxsackievirus A
	6	Coxsackievirus B
	30	ECHO-Viren
	4	Humane Enteroviren
	18	Enteroviren der Affen
	2	Bovine Enteroviren
	8	Porcine Enteroviren
Aphthoviren	7	Maul- und Klauenseuche-Virus (FMDV)
	1	Equines Rhinitis A- Virus
Cardioviren	1	Encephalomyocarditis-Virus (EMCV)
	1	Theilers Murines Encephalomyelitis-Virus (TMEV)
Hepatovirus	1	Hepatitis-A-Virus (HAV)
Parechovirus	2	humanes PeV-1 / humanes PeV-2
Erbovirus	1	Equines Rhinitis B-Virus
Kobuvirus	1	Aichi Virus
Teschovirus	10	Porcine Teschoviren

Tabelle 1: Systematik der Picornaviren. Die beschriebenen Zahlen der Serotypen stellen Anhaltspunkte dar und erheben keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Die Hauptgenera sind die Rhinoviren, Enteroviren, Aphthoviren und Cardioviren. Die Genera Parechovirus, Erbovirus, Kobuvirus und Teschovirus wurden erst kürzlich in die Familie der Picornaviren aufgenommen und sind noch nicht eingehender erforscht. Es gibt mindestens 10 weitere Spezies, die den Picornaviren zugerechnet werden, aber noch nicht klassifiziert werden konnten (nach „7th ITCV Report, Classification of the Picornaviruses“).

Das Poliovirus gilt als Prototyp der Picornaviren, da es das intensivst erforschte Virus innerhalb dieser Familie darstellt. Die Gattung Poliovirus weist drei verschiedene Serotypen auf (bezeichnet als 1, 2 und 3), die sich in ihrer Sequenz teilweise deutlich unterscheiden. Das Genom der Polioviren ist komplett sequenziert (Racaniello et al., 1981; Kitamura et al., 1981) und sein Kapsid ist bis hin zur Atom-Ebene bekannt (Hogle et al., 1985). Den Picornaviren und speziell Poliovirus kommt heute eine besondere Bedeutung als Modellsystem zu, sowohl für die Untersuchung der

Vermehrungsstrategien anderer Viren, da sie häufig auf ähnlichen Mechanismen beruhen, als auch für die Untersuchung zellulärer Prozesse, in die die Viren eingreifen. Die generelle Vermehrungsstrategie in der Evolution der Viren beruht auf einer Reduktion der Ausstattung an Genen bzw. Proteinen. Damit begeben sich die Viren für ihre Vermehrung in eine zunehmende Abhängigkeit von der Wirtszelle, jedoch entsteht daraus der Vorteil der Reduktion der Größe des Genoms und des Kapsids. Diese Reduktion ermöglicht eine effiziente Verbreitung der Virionen. Die Verwendung zellulärer Faktoren und Prozesse ermöglicht zudem eine schnelle Vermehrung der Viren in der Wirtszelle. Bei Picornaviren und somit auch bei Poliovirus ist diese Strategie sehr konsequent umgesetzt. Da die Picornaviren ein RNA-Genom besitzen, das direkt durch den zellulären Proteinsyntheseapparat abgelesen werden kann, wird der in Zellen vorhandene Zwischenschritt der Synthese einer DNA als stabiles Genom ausgelassen. Die viralen Proteine greifen gezielt in einzelne Prozesse der Wirtszelle ein und „programmieren“ diese für die Vermehrung des Virus. Die Effizienz des picornaviralen Vermehrungszyklus zeigt das Beispiel des FMDV, bei dem schon 3 bis 4 Stunden nach Infektion einer Zelle durch ein einziges Virion etwa 100.000 neue, infektiöse Viren freigesetzt werden.

Morphologie des Poliovirus

Das RNA-Genom der Picornaviren ist von einem Arrangement viraler Proteine umgeben, dem sogenannten Kapsid. Das Kapsid ist aus vier viralen Strukturproteinen, den Virion-Proteinen VP1, VP2, VP3 und VP4 aufgebaut, von denen jeweils eins zum Aufbau eines Protomers, der ersten organisatorischen Einheit des Kapsids, verwendet wird. Das Protomer wird gemäß seinem Sedimentationskoeffizienten als „5S-Partikel“ bezeichnet. Jeweils fünf Protomere sind zu Pentamer-Strukturen organisiert (14S-Partikel) und zwölf dieser Pentamere, also insgesamt 60 Protomere bilden ein funktionelles, leeres Kapsid (80S-Partikel). Durch den Aufbau aus Pentameren erhält das picornavirale Kapsid die charakteristische Form eines Ikosaeders.

Die Proteine VP1, VP2 und VP3 sind zur Außenseite des Protomers orientiert und bilden die Oberfläche des Kapsids. Sie sind alle in der gleichen Art gefaltet und bilden daher die Grundlage für den ikosaedralen Aufbau des Kapsids. Durch die Faltung und die Anordnung der Proteine VP1, VP2 und VP3 wird eine Einbuchtung von ca. 2,5 nm Durchmesser auf der Oberfläche eines jeden Protomers gebildet, der sogenannte „Canyon“. Im Canyon finden die Interaktionen zwischen dem Kapsid und den Rezeptorproteinen statt, die für das Binden des Virus an die Wirtszelle verantwortlich sind. Nach der Endocytose des Virus haben die Strukturproteine essentielle Funktionen beim Freisetzen der viralen RNA in das Cytoplasma der infizierten Zelle.

Die endgültige Reifung des Kapsids kann nur im Zusammenhang mit der Verpackung der viralen RNA geschehen, durch die die Spaltung des Vorläufers VP0 in die Proteine VP2 und VP4 induziert wird. VP4 bindet direkt an die virale RNA und ist daher auch in den Protomeren so angeordnet, daß es zum Innern des Kapsids, zum sogenannten „Core“ zeigt. Der Core wird von der viralen RNA und

dem kovalent daran gebundenen Protein, dem VPg gebildet. Das virale Kapsid mit der RNA kann noch vor der Spaltung des VP0 als Provirion oder 150S-Partikel isoliert werden, nach der Spaltung in VP2 und VP4 ist das funktionelle Virion gebildet, das auch als 156S-Partikel bezeichnet wird. Die Verpackung des viralen Genoms wird durch eine starke Kondensation der RNA erreicht. Wenn die virale RNA komplett ausgebreitet wäre, hätte sie eine Länge von 2,5 μm , das entspricht etwa einem Fünftel der Länge einer durchschnittlichen fibroblastischen Zelle, die von Poliovirus infiziert wird. Für die Enkapsidierung wird sie bis auf weniger als 30 nm (Durchmesser des Kapsids) kondensiert.

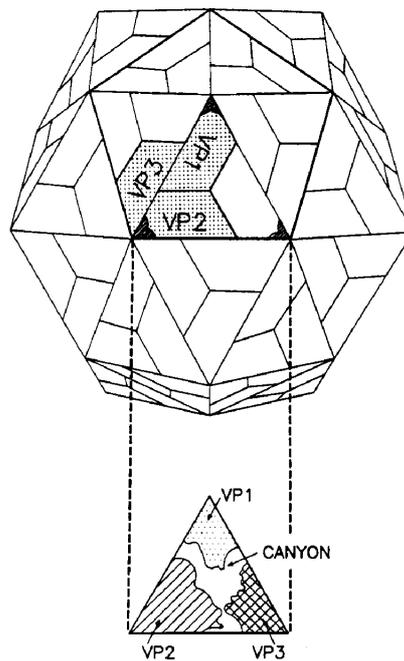


Abb. 4: Aufbau des Poliovirus Kapsids: Geometrie der Oberflächenstruktur mit Anordnung der Kapsidproteine. VP1, VP2 und VP3 haben die gleiche Faltungsgeometrie und sind die Grundlage für die Bildung des Ikosaeders und des Canyons, an dem der Rezeptor der Wirtszelle bindet. VP4 interagiert mit der viralen RNA auf der Innenseite des Kapsids, dem sogenannten „Core“ (nicht abgebildet) (nach Rueckert, 1996).

Genomorganisation des Poliovirus

Das Genom der Picornaviren besteht aus einer einzelsträngigen RNA, die in positiver Polarität vorliegt, also direkt als „messenger RNA“ translatiert werden kann. Das Genom ist in drei Abschnitte unterteilt (siehe Abb. 5), zwei nicht translatierte Bereiche am 5'- und am 3'-Ende der RNA (5'-NTR und 3'-NTR, für „non translated region“), die entscheidende Bedeutung für die Translation und die Replikation der viralen RNA haben, sowie einen offenen Leseraster („open reading frame“ = ORF) zwischen diesen Bereichen.

Die genomische RNA der Picornaviren setzt sich aus ca. 7400 Nukleotiden zusammen, diese Zahl variiert jedoch bei den verschiedenen Spezies (von 7209 Nukleotiden beim Humanen Rhinovirus 14 bis zu 8450 Nukleotiden bei den Aphthoviren). Die 5'-NTR der Picornaviren ist mit ca. 740 Nukleotiden ungewöhnlich lang, ihre Länge variiert jedoch ebenfalls von 624 Nukleotiden beim humanen Rhinovirus bis zu ca. 1200 Nukleotiden bei FMDV. Die RNA der 5'-NTR weist eine charakteristische Sekundärstruktur auf, die mehrere konservierte Haarnadelstrukturen, sogenannte „Stem-loops“, bildet, die untereinander Tertiärstrukturen bilden. Diese Region wird sowohl für die Replikation der viralen RNA als auch für die Translationsinitiation der Picornaviren benötigt.

Der für die Replikation der viralen RNA wichtige Teil der 5'-NTR ist das sogenannte „Cloverleaf“, eine kleeblattartige Sekundärstruktur, die aus drei konservierten Stem-loops besteht. Durch die Bindung zellulärer und viraler Faktoren an das Cloverleaf wird die Initiation der Replikation des viralen RNA-Genoms reguliert.

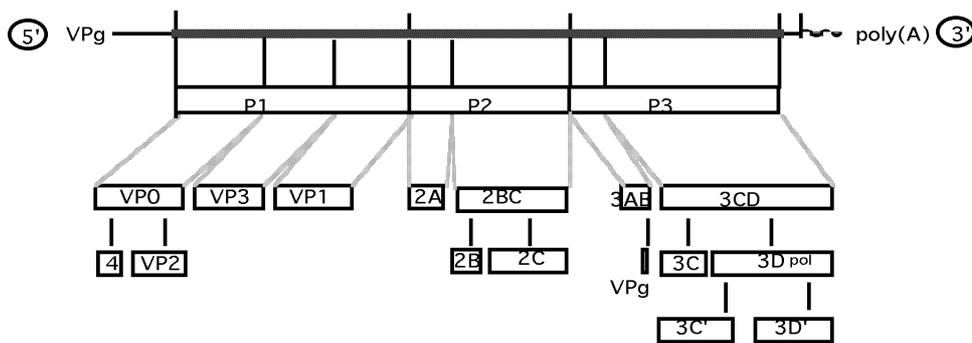


Abb. 5: Genomorganisation des Poliovirus. Die codierende Region ist ein durchgehender offener Leseraster (ORF) mit den Genomregionen P1 bis P3. Das virale Polyprotein wird ko- und posttranslational in Vorläuferproteine (Precursor) und die reifen Proteine prozessiert. Flankiert wird der ORF von zwei nicht translatierten Regionen (NTR), die essentielle Bedeutung für die Replikation des Virus haben.

Der zweite, komplexer aufgebaute Teil der 5'-NTR besteht aus sechs, teils verzweigten Stem-loops und wurde zunächst als „Ribosome Landing Pad“ (RLP; Pelletier und Sonenberg, 1988) bezeichnet, allerdings hat sich die Bezeichnung „Internal Ribosome Entry Site“ (IRES; Jang et al., 1990) allgemein durchgesetzt. Die IRES spielt die zentrale Rolle bei der Translationsinitiation der Virus-RNA, die sich von der Initiation der Translation normaler zellulärer mRNAs deutlich unterscheidet. Diese ist nicht abhängig vom 5'-Ende der RNA und wird daher als „interne Translationsinitiation“ bezeichnet. Attenuierte Viren, die als Vakzine verwendet werden, haben oftmals Mutationen im Bereich der 5'-NTR, die die Effizienz der Replikation und/oder Translation in bestimmten Zelltypen reduzieren. Von zentraler Bedeutung für den attenuierten

Charakter der Polio-Vakzine ist eine Punktmutation im Bereich der Domäne V in der Poliovirus IRES, die beim Typ 1 an Position 480, bei Typ 2 an Position 481 und bei Typ 3 an Position 472 des Genoms zu finden ist (Kawamura et al., 1989; Moos et al., 1989; Westrop et al., 1989; Christodoulou et al., 1990; Svitkin et al., 1990).

Die 3'-NTR ist mit ca. 70 Nukleotiden deutlich kürzer als die 5'-NTR und enthält in ihrem 3'-terminalen Bereich ausschließlich Adenin-Nukleotide, die den sogenannten „Poly A-Schwanz“ bilden. Der Poly A-Schwanz ist auch in zellulären mRNAs vorhanden, ist dort aber im Gegensatz zu den Picornaviren nicht genomisch codiert, sondern wird durch die zelluläre Poly A-Synthetase posttranskriptionell angehängt.

Der offene Leseraster aus ca. 6600 Nukleotiden codiert für ein einziges Polyprotein von ca. 247 kDa, was ko- und posttranslational durch virale Proteasen prozessiert wird. Durch diese Prozessierung wird das virale Polyprotein nach einem präzisen Schema proteolytisch zunächst in teils schon funktionelle Vorläuferproteine („Precursor“) gespalten, die dann weiter bis in die einzelnen Proteine zerlegt werden (detaillierte Beschreibung im Kapitel 1.3. Translation). Die Proteine der Genomregion P1 stellen die Strukturproteine des Kapsids dar, während die Proteine der Regionen P2 und P3 die Nichtstrukturproteine umfassen, die verschiedene Funktionen erfüllen. Die Einteilung der Gene auf der RNA erfolgt nach einem Vorschlag von Rueckert und Wimmer (Rueckert und Wimmer, 1984).

Im Gegensatz zu den zellulären mRNAs befindet sich am 5'-Terminus der viralen RNA kein gebundenes „Cap“-Nukleotid (engl. für Kappe). Picornaviren besitzen dagegen ein Protein von 20 bis 24 Aminosäuren Länge, das kovalent über eine Phosphodiesterbindung mit einer Hydroxylgruppe einer Tyrosin-Seitenkette an die virale RNA gebunden ist. Dieses sogenannte „VPg“ (virus protein genome-linked), ist neben seiner Rolle als Primer bei der Replikation der Virus-RNA (Kuhn und Wimmer, 1987) ebenfalls an der Verpackung der RNA in das Kapsid beteiligt (Rueckert, 1996).

1.3. Infektionszyklus des Poliovirus

Die Vermehrung der Picornaviren findet ausschließlich im Cytoplasma der infizierten Zellen statt, auf dessen Umgebung und Faktoren die virale Replikationsmaschinerie angewiesen ist. Außerhalb der Wirtszelle findet nur die Übertragung der Viren auf die nächste Zelle bzw. auf den nächsten Organismus statt. Das Virus muß entsprechend zweimal in seinem Vermehrungszyklus das Milieu wechseln, beim Eintritt in die Zelle zu Beginn der Infektion und beim Austritt aus der Zelle nach einer erfolgreichen Vermehrung.

Der Infektionszyklus des Poliovirus beginnt mit dem Andocken des Viruskapsids an ein Rezeptorprotein auf der Plasmamembran der Wirtszelle. Der Rezeptor, der von Poliovirus für den Zelleintritt benutzt wird, das sogenannte CD155, gehört zur Superfamilie der Immunglobuline und ist ein integrales Membranprotein, das ubiquitär exprimiert wird (Mendelsohn et al., 1989).

Durch die folgende rezeptorvermittelte Endocytose wird das Virus in die Zelle eingeschleust, indem es sich in die Plasmamembran einstülpt und dabei von einem Stück der Plasmamembran umgeben wird, was zur Bildung eines endocytotischen Vesikels, eines sogenannten Endosoms führt. Das RNA-Genom des Poliovirus wird anschließend durch den Prozeß des sogenannten „Uncoating“ im Cytosol freigesetzt, wobei die virale RNA das Kapsid und die Membran des Endosoms passieren muß. Dies wird durch eine Konformationsänderung der Kapsidproteine ermöglicht, die sich nach der Bindung an den Poliovirusrezeptor als sogenanntes 135S-Partikel nachweisen läßt (Belnap et al., 2000). Dabei kommt es zu einer Umlagerung der Untereinheiten des Kapsids, die zur Bildung eines Kanals in der Membran des Endosoms führt, durch den die virale RNA in das Cytoplasma der Zelle gelangt (Belnap et al., 2000).

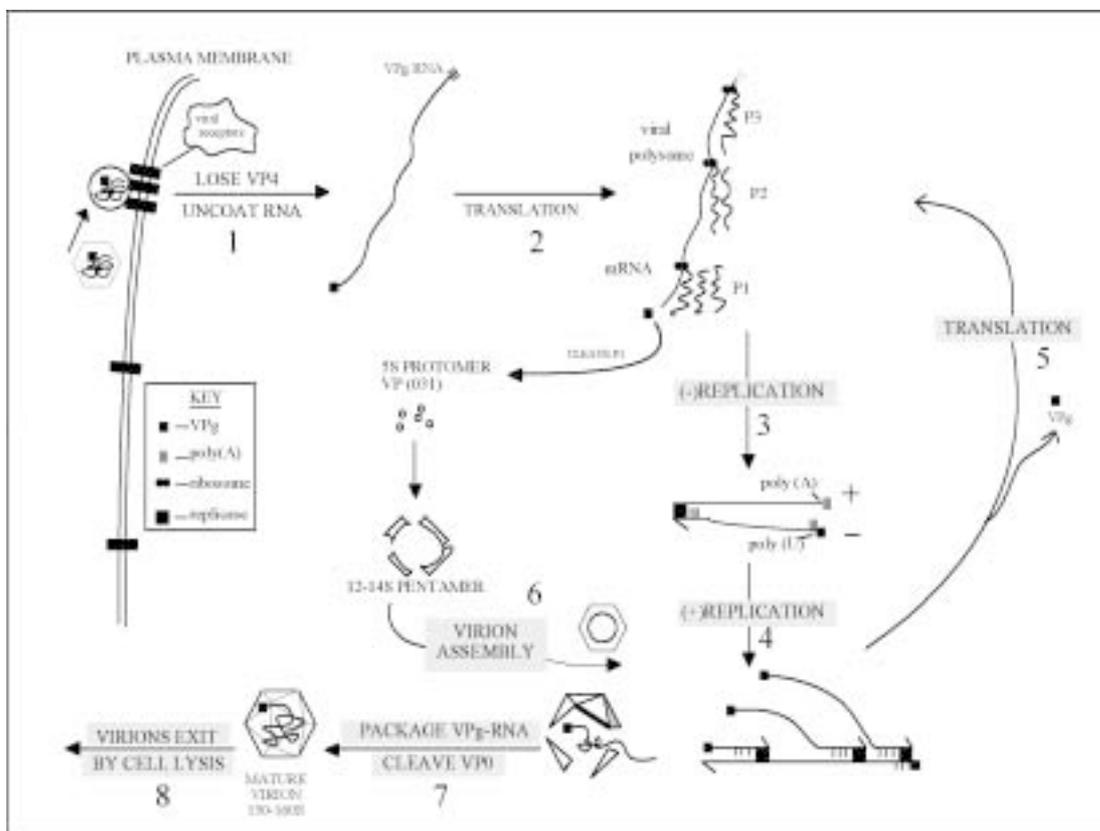


Abb. 6: Infektionszyklus des Poliovirus. Der Infektionszyklus setzt sich aus acht Schritten zusammen: 1.) Bindung an den Poliorezeptor CD155, Penetration der Wirtszelle und Freisetzen der viralen RNA („uncoating“). 2.) Translation der viralen RNA. 3.) Synthese der Minus-Strang RNA. 4.) Asymmetrische Synthese der Plus-Strang RNA. 5.) Translation der neu synthetisierten RNA. 6.) Zusammenbau des Kapsids aus Kapsidproteinen (1A - 1D) („assembly“). 7.) Verpackung viraler RNA und Reifespaltung von VPg („packaging“). 8.) Freisetzung infektiöser Viren („Lyse“) (nach Rueckert, 1996).

Das virale RNA-Genom wird durch seine positive Polarität direkt durch den zellulären Proteinbiosynthese-Apparat translatiert. Dabei kommt es zu multipler Translationsinitiation und somit zum Auftreten von Polysomen, weshalb die virale RNA ebenso effizient translatiert werden kann, wie zelluläre mRNAs. Nach der Translation findet, unter Beteiligung viraler Proteine, sowohl die Replikation des Virus-Genoms, als auch der Zusammenbau der Kapside aus den Strukturproteinen statt. Die Replikation der Virus-RNA wird durch die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase 3D durchgeführt und verläuft nach einem bestimmten Schema, das gewährleistet, daß die Plus-Strang RNA als Genom der neuen Viren in großer Menge (bis zu 100-fach gegenüber der Minus-Strang RNA) produziert wird (siehe Kapitel 1.3. RNA-Replikation). Der Infektionszyklus der Picornaviren endet mit der Verpackung des Virus-Genoms in die Kapside und mit der Lyse der Wirtszelle, durch die die neuen Viren freigesetzt werden. Pro infizierter Zelle können nach deren Lyse mehr als 100.000 Viren freigesetzt werden, von denen allerdings wegen der Fehlerrate der 3D-Polymerase nur einige Tausend infektiös sind (Rueckert et al., 1996).

Die Zeiträume, in denen sich ein solcher Infektionszyklus abspielen kann, hängen vom Serotyp des Virus sowie vom Typ der infizierten Zelle ab. FMDV gilt als das Virus mit dem kürzesten Infektionszyklus, bei dem unter normalen Umständen die Dauer von der Infektion bis zur Lyse der Wirtszelle nur 3 bis 4 Stunden beträgt. Bei Poliovirus sterben infizierte Zellen (z.B. die humane Krebszelllinie HeLa als Laborstandard) normalerweise zwischen 4 und 5 Stunden nach der Infektion.

Von zentraler Bedeutung für den korrekten Ablauf des Infektionszyklus ist die ko- und posttranslationale Prozessierung der viralen Proteine. Eine in diesen Prozeß involvierte virale Protease, das Poliovirus-Protein 2A bewirkt neben ihrer Funktion bei der Prozessierung viraler Proteine auch die Spaltung des eukaryotischen Initiationsfaktors eIF-4G, wodurch die Translation der Wirtszelle abgeschaltet wird und der zelluläre Proteinsyntheseapparat ausschließlich der viralen Translation zur Verfügung steht (Belsham, 1992).

Translation

Durch die Translation wird die genetische Information der RNA in die entsprechende Aminosäuresequenz von Proteinen übersetzt. Die Translation ist also ein zentraler Prozeß zur Expression von Genen und ist daher auch das Ziel für verschiedene zelluläre Regulationsmechanismen.

Die Translation der Picornaviren ist in ihrem Grundzügen mittlerweile recht gut verstanden, sie findet an Ribosomen statt, die entweder frei im Cytoplasma oder gebunden an die Membranen des ER vorkommen. Kürzlich konnte in einem eleganten Ansatz gezeigt werden, daß sowohl an freien als auch an membrangebundenen Ribosomen die Translation initiiert werden kann (Potter et al., 2001; Potter und Nicchitta, 2000), sodaß es wahrscheinlich ist, daß die Poliovirus-Translation an den Membranen des ER stattfindet. Allerdings fehlt der endgültige Beweis dafür bis heute.

Der Ablauf der Translation läßt sich in drei Schritte gliedern, die Initiation, die Elongation und die Termination. Die Initiation der Translation folgt bei Picornaviren einem Mechanismus, der sich deutlich von der Initiation der normalen zellulären mRNAs unterscheidet. In den zellulären mRNAs wird die Translation am sogenannten Cap-Protein initiiert, das kovalent an das 5'-Ende der mRNA gebunden ist. Dabei stellt die Interaktion des eukaryotischen Initiationsfaktors eIF-4G (oder p220) mit dem Cap-Protein der mRNAs den ersten Schritt der Translation dar. Das picornavirale Genom weist kein Cap am 5'-Ende auf, sondern ein kovalent gebundenes VPg, welches nach der Infektion der Wirtszelle abgespalten wird, also für die Initiation der Translation nicht essentiell ist.

Die Initiation der picornaviralen Translation findet intern auf der RNA statt und ist vom 5'-Ende der RNA und dem Cap-Protein unabhängig. Für diesen Vorgang ist eine besondere Struktur verantwortlich, die in der 5'-NTR des viralen Genoms liegt und nach ihrer Funktion als Internal Ribosome Entry Site (IRES) bezeichnet wird.

Das IRES-Element der Picornaviren ist ca. 450 Nukleotide lang und besitzt an seinem 3'-Ende einen Pyrimidin-Trakt. In einem konservierten Abstand von 20 bis 25 Nukleotiden hinter diesem Pyrimidin-Trakt liegt ein Startcodon (AUG-Sequenz), dessen Abstand von großer Bedeutung für die Effizienz der Translationsinitiation ist (Kaminski et al., 1994). Bei Poliovirus wird ein 160 Nukleotide weiter 3'-wärts liegendes AUG-Codon zum Start der Proteinsynthese benutzt, während das konservierte AUG-Codon nur zur Positionierung des Ribosoms dient. Das Ribosom erreicht dieses authentische Startcodon wahrscheinlich durch eine exakte Positionierung („ribosome guiding“) der 40S-Untereinheit des Ribosoms auf der RNA, wobei verschiedene zelluläre Initiationsfaktoren eine Rolle spielen. Nur wenige, meist einzelsträngige Bereiche der IRES sind bei den verschiedenen Gruppen der Picornaviridae konserviert, was auf eine Funktion dieser Bereiche für Proteinbindung schließen läßt (Jackson et al., 1994). Bei der internen Initiation der Translation spielen Initiationsfaktoren (eIF) eine Rolle, die auch für die Cap-abhängige Initiation benötigt werden. Bei der viralen Translationsinitiation werden zusätzlich sogenannte „nicht-kanonische Initiationsfaktoren“ rekrutiert, die normalerweise nicht in diesen Prozeß involviert sind, sondern andere Funktionen in der Wirtszelle wahrnehmen, so z. B. das Autoantigen „La“ bei Poliovirus (Meerovitch et al., 1993), das normalerweise Funktionen bei der Initiation und Termination von RNA-Polymerase III-abhängigen Transkriptionen übernimmt (Gottlieb und Steitz, 1989). Entgegen früheren Vermutungen sind zur internen Initiation der Translation offensichtlich keine viralen Proteine nötig. Die zelluläre Proteinbiosynthese wird durch die Spaltung eines der zentralen Initiationsfaktoren (eIF-4G) durch eine virale Protease (2A) blockiert, womit der viralen Translation alle benötigten Faktoren ohne Konkurrenz durch die zelluläre Proteinsynthese zur Verfügung stehen (Wimmer et al., 1993; Belsham, 1992; Molla et al., 1993). Während der viralen Translation entstehenden Vorläufer und reifen Proteine nehmen verschiedene Schlüsselfunktionen bei der Replikation des Virus ein (siehe Kapitel 1.3. RNA-Replikation).

Nachdem die Funktion der IRES-Elemente bei der internen Translationsinitiation der Picornaviren entdeckt wurde, konnte gezeigt werden, daß funktionelle IRES-Elemente ebenso bei anderen Viren und bei einer Reihe zellulärer mRNAs vorkommen (Macejak und Sarnow, 1991; Oh et al., 1992; Vagner et al., 1995).

RNA-Replikation

Die Replikation des Poliovirus RNA-Genoms findet im Cytoplasma der infizierten Zelle statt und folgt einem speziellen asymmetrischen Mechanismus, der es ermöglicht das virale Genom gegenüber den Replikationsintermediaten stark anzureichern.

Die Replikation beginnt zunächst mit der Synthese einer zum Virus-Genom komplementären Minus-Strang RNA. Dieser Vorgang führt zu einem doppelsträngigen RNA-Molekül, der sogenannten „replicative form“ (RF). Die Minus-Strang-RNA dient als Matrize für die Synthese neuer Plus-Stränge, die in der Zelle drei Aufgaben erfüllen. Sie dienen als mRNA, von der ausgehend die virale Translation stattfindet, als Matrize für die Synthese weiterer viraler RNA, und schließlich der Verpackung im Kapsid als Genom der neuen Viren. Die Synthese neuer Plus-Stränge geschieht durch einen auf mehrfacher Initiation beruhenden, asymmetrischen Replikationsmechanismus innerhalb des „replicative intermediate“ (RI). Durch diese asymmetrische Replikation bei der Synthese neuer Plus-Strang RNA wird gewährleistet, daß diese in bis zu hundertfach höherer Konzentration im Vergleich zur Minus-Strang RNA in der Zelle produziert wird (Bolten et al., 1998; Novak and Kirkegaard, 1991).

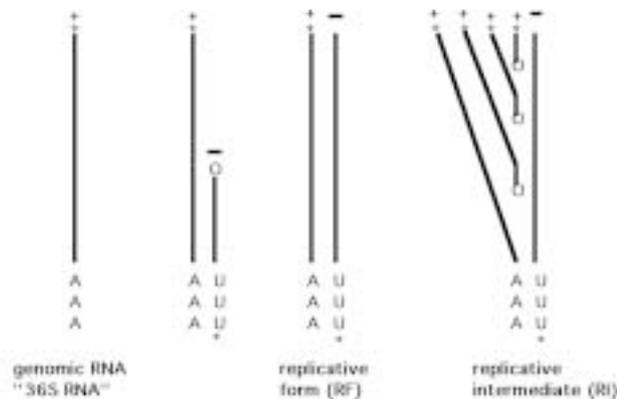


Abb. 7: Mechanismus der RNA-Replikation des Poliovirus. Ausgehend von der genomischen RNA des Poliovirus mit Plus-Polarität wird zunächst ein komplementärer Minus-Strang synthetisiert, was zur doppelsträngigen „replicative form“ (RF) führt. Dieser Minus-Strang RNA dient als Matrize für die Synthese neuer Plus-Stränge. Durch die multiple Initiation der Plus-Strang Synthese entsteht das „replicative intermediate“ (RI), wodurch der hohe Überschuß an genomischer Plus-Strang RNA erreicht wird (nach Takeda et al., 1986).

Beide Schritte der RNA-Replikation werden durch die viral codierte RNA-abhängige RNA-Polymerase (3D) katalysiert, daher kann die Replikation erst nach der Translation des viralen Genoms initiiert werden.

Die RNA-Polymerasen der Picornaviren weisen eine Fehlerrate von 1×10^{-4} Basen auf, die dazu führt, daß ein Teil der nach dem Infektionszyklus freigesetzten Virionen nicht infektiös sind. Der evolutorische Vorteil dieser hohen Fehlerrate besteht jedoch in einer höheren Wahrscheinlichkeit neue, besser angepaßte Mutanten des Virus zu erzeugen. So kommt es zum Auftreten von sogenannten Quasispezies des Virus. Dieser Begriff umschreibt das Phänomen, daß zu keiner Zeit ein genetisch genau definierter Virustyp existiert, sondern immer eine Viruspopulation von verschiedenen Varianten mit mehr oder weniger starken Abweichungen (Holland et al., 1992).

Die Synthese der Minus-Strang RNA wird in einem speziellen Kompartiment im Cytoplasma der Zelle durchgeführt. Die virale Polymerase benötigt ein „Priming“ (Bildung einer Startsequenz) bei der Minus-Strang Synthese. Dies geschieht durch das VPg-Protein, was als zweifach uridyliertes VPgpUpU an den Poly A-Schwanz des 3'-Endes der Plus-Strang RNA bindet und damit die Synthese neuer Minus-Stränge durch die RNA-abhängige-RNA-Polymerase initiiert (Paul et al., 1998).

Die Synthese der neuen Plus-Stränge geht mit der Bildung eines membrangebundenen Replikationskomplexes einher. In diesem Replikationskomplex, der ein eigenes Kompartiment in der Wirtszelle darstellt, finden alle Prozesse der Replikation der viralen RNA statt. Für das Priming bei der Plus-Strang Synthese ist vermutet worden, daß dies ebenfalls durch VPg geschehen könnte.

Nach der Translation des Virus-Genoms werden durch virale Proteine oder deren Vorläufer spezifische Membranveränderungen in der Wirtszelle induziert; an denen die verschiedenen Prozesse der Replikation stattfinden (Bienz et al., 1980)(siehe Kapitel 1.4. Virus-induzierte Membranveränderungen). Diese viral induzierten Membranveränderungen bestehen aus Vesikeln, an deren Membranen an der Außenseite (cytoplasmatische Seite) der Replikationskomplex aufgebaut wird (Bienz et al., 1990; Bienz et al., 1992; Troxler et al., 1992), in dem die Synthese der viralen RNA stattfindet.

Der Aufbau des viralen Replikationskomplexes wird hauptsächlich durch Protein-Interaktionen ermöglicht, jedoch spielen die Interaktionen der Proteine mit den Membranen der viral induzierten Vesikel die Hauptrolle für die Initiation der viralen RNA-Replikation. Entsprechend konnten an den viral induzierten Membranveränderungen einzelne virale Proteine, bzw. deren nicht-prozessierte Vorläufer sowie Plus- und Minus-Strang RNA des Virus durch Immunfluoreszenz und in situ-Hybridisierung nachgewiesen werden (Bolten et al., 1998).

Trotz der essentiellen Bedeutung der induzierten Membranveränderungen für die virale Replikation ist bis heute noch wenig über deren Funktion bei der RNA-Replikation bekannt. Die Akkumulation der viralen Vesikel im Cytoplasma führt zu einer Kompartimentalisierung der

Wirtszelle. Dies ist für die Replikation des viralen Genoms essentiell, denn die virale RNA-Polymerase 3D zeigt keine Substratspezifität und kann jede beliebige mRNA replizieren. Nur durch die Kompartimentalisierung der Zelle erreicht das Virus, daß nur die im Replikationskomplex vorliegende virale RNA repliziert wird.

Mit Hilfe verschiedener Techniken konnte gezeigt werden, daß das Protein 2BC eine essentielle Rolle beim Aufbau des Replikationskomplexes spielt (Cho et al., 1994). Die Präsenz der Poliovirus-Proteine 2BC, 2B und 2C im Replikationskomplex wurde nachgewiesen (Bienz et al., 1992; Rodriguez und Carrasco, 1995) und es gibt Hinweise auf eine Beteiligung dieser Proteine an der RNA-Synthese (Teterina et al., 1992). Weitere Nichtstrukturproteine erfüllen verschiedene Aufgaben bei der Vermehrung des Virus, z.B. als Primer bei der Initiation der RNA-Replikation (VPg), als RNA-Polymerase (3D) oder als Protease (2A, 3C, 3CD).

Da die gleichen RNA-Moleküle als Template für die RNA-Replikation und für die Translation benötigt werden, müssen diese beiden Prozesse während des Infektionszyklus genau reguliert werden. Die virale RNA muß durch zwei verschiedene zelluläre Proteinkomplexe erkannt werden, die diese beiden Prozesse durchführen. Eine erfolgreiche RNA-Replikation kann dabei erst nach der initialen Translation erfolgen, da die RNA-Polymerase viral codiert ist und nicht im Kapsid enthalten ist. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß für die Regulation dieser Prozesse sowohl virale als auch zelluläre Faktoren eine Rolle spielen (Herold und Andino, 2001). Das virale Protein 3CD und das zelluläre Protein PCBP (für „Poly rC Binding Protein“) binden an die „Cloverleaf“-Struktur der 5'-NTR der Poliovirus-RNA und bilden so einen Ribonukleoproteinkomplex (RNP). Dieser RNP kann mit einem an den Poly A-Schwanz gebundenen Protein, dem PABP (für „poly A binding protein“) interagieren und so die virale RNA über eine Proteinbrücke zirkularisieren. Diese Zirkularisierung ist die Voraussetzung für die Initiation der Minus-Strang Synthese. Die Bindung dieser Faktoren an das „Cloverleaf“ determiniert wahrscheinlich das Umschalten von Translation zu Replikation. Entsprechend konnte gezeigt werden, daß eine Bindung des PCBP an das „Cloverleaf“ die Translation der viralen RNA steigert (Gamarnik und Andino, 1997). Im Gegensatz dazu reduziert die Bindung von 3CD am Cloverleaf die Translationsrate, steigert aber die Syntheserate der Minus-Strang RNA (Gamarnik und Andino, 1998). Das Umschalten von Translation zu Replikation der Poliovirus-RNA wird also durch eine Interaktion beider Enden der viralen RNA über Protein-Protein- sowie Protein-RNA-Interaktionen reguliert.

1.4. Virus-induzierte Membranveränderungen

Viele animalpathogene Viren verändern durch ihre Replikation die intrazelluläre Struktur und Organisation ihrer Wirtszellen. Für alle Plus-Strang-RNA-Viren, die bisher untersucht wurden, konnten solche morphologischen Veränderungen in der Wirtszelle gefunden werden, die jedoch in ihrer Form von Virus zu Virus variabel sind (Egger et al., 2000). Die charakteristischen

morphologischen Veränderungen der Wirtszelle führten in vielen Fällen schon zu einer exakten Beschreibung einer viralen Infektion lange bevor das entsprechende Virus bekannt war.

Picornaviren induzieren vorwiegend Veränderungen der intrazellulären Membranen der Wirtszelle, deren Funktion direkt im Zusammenhang mit dem Zelltod steht. Die Membranveränderungen, die mit der Poliovirus-Infektion einhergehen sind die am besten untersuchten morphologischen Veränderungen durch virale Infektionen, da schon in den sechziger Jahren des letzten Jahrhunderts (Dales et al., 1965) durch Untersuchungen Poliovirus-infizierter Zellen im Elektronenmikroskop diese Veränderungen detailliert beschrieben wurden. Die Infektion der einzelnen Zelle und die Symptome des infizierten Organismus sind gekoppelt, denn die virale RNA-Replikation deren Voraussetzung die Membranveränderungen sind, führt zum Absterben der infizierten Zellen. Dieser sogenannte cytopathische Effekt („CPE“) korreliert also mit den Symptomen der Infektion und des Krankheitsverlaufes des infizierten Organismus (Egger et al., 2000). Kürzlich konnte gezeigt werden, daß neben dem CPE auch Apoptose als Ursache für das Absterben Picornavirus infizierter Zellen vorkommen kann (Agol et al., 1998). Apoptose ist eine Art zelluläres Suizidprogramm, das durch verschiedene Faktoren geschädigte Zellen über eine spezielle Signalkaskade anschalten um sich selbst zu töten (Roulston et al., 1999). Apoptotische Zellen sind durch Präsentation von speziellen Proteinen auf ihrer Zellmembran gut vom Immunsystem zu erkennen und werden daher durch Makrophagen abgebaut. Die Apoptose stellt also einen Abwehrmechanismus des Organismus dar, indem eine Vermehrung der geschädigten Zellen bzw. des infizierenden Virus verhindert und damit z.B. eine umfangreiche virale Infektion inhibiert wird (LeGrand, 2000). Bisher ist jedoch noch nicht bekannt, welche Rolle die Apoptose bei der Infektion von Picornaviren auf der Ebene des Organismus spielt. Bei Poliovirus-Infektionen in Zellkulturen ist der CPE normalerweise die Ursache für das Absterben infizierter Zellen. Nur wenn experimentell die Replikation des Virus blockiert wurde (Agol et al., 1998), oder das langsam replizierende HAV zur Infektion eingesetzt wurde, hatten die Zellen genug Zeit, um die Apoptose-Kaskade auszulösen (Brack et al., 1998; Gosert et al., 2000).

Die in der Poliovirus-Infektion beobachteten Membranveränderungen führen zum Absterben aller infizierter Zellen, unter anderem auch neuronaler Zellen, wie die Ganglienzellen der Motoneurone. Da Neuronen nach ihrer Differenzierung nicht mehr teilungsfähig sind, also die abgestorbenen Motoneuronen nicht ersetzt werden können, führen die Membranveränderungen zu den bekannten Lähmungen der Extremitäten, der prominenten Form der paralytischen Poliomyelitis.

Die zellulären Membranveränderungen bei der Infektion mit Picornaviren bestehen aus der Induktion membranumhüllter Vesikel von 100 nm bis 300 nm Durchmesser. Sie sind bisher für Poliovirus (Dales et al., 1965; Bienz et al., 1972; Bienz et al., 1983), Coxsackievirus (Bienz et al., 1972), Maul- und Klauenseuche-Virus (Weber et al., 1996), Theiler's Virus (Frankel et al., 1987) und Hepatitis A-Virus (Gosert et al., 2000) nachgewiesen worden. Bei Poliovirus bilden sich diese membranumhüllten Vesikel schon früh in der Infektion (ab 2 Stunden nach der Infektion) und liegen

zunächst in Nestern zu einigen wenigen Vesikeln im Cytoplasma der Wirtszelle vor (Egger et al., 2000). Im Verlauf der Infektion nimmt die Zahl dieser sogenannten Poliovirus-Vesikel soweit zu, daß das Cytoplasma der Wirtszelle vollständig mit diesen gefüllt ist (Abb. 8). In den späten Phasen der Infektion, zeitgleich mit der Akkumulation der viralen Vesikel, nimmt die Menge und Ausdehnung des endoplasmatischen Retikulums (ER) und des Golgi-Apparats stark ab (Bienz et al., 1983; 1994). Daher wurde vermutet, daß die Membranen dieser Zellorganellen für die Bildung der Poliovirus-Vesikel rekrutiert werden könnten (Bienz et al., 1983; 1994; Schlegel et al., 1996; Irurzun et al., 1992).

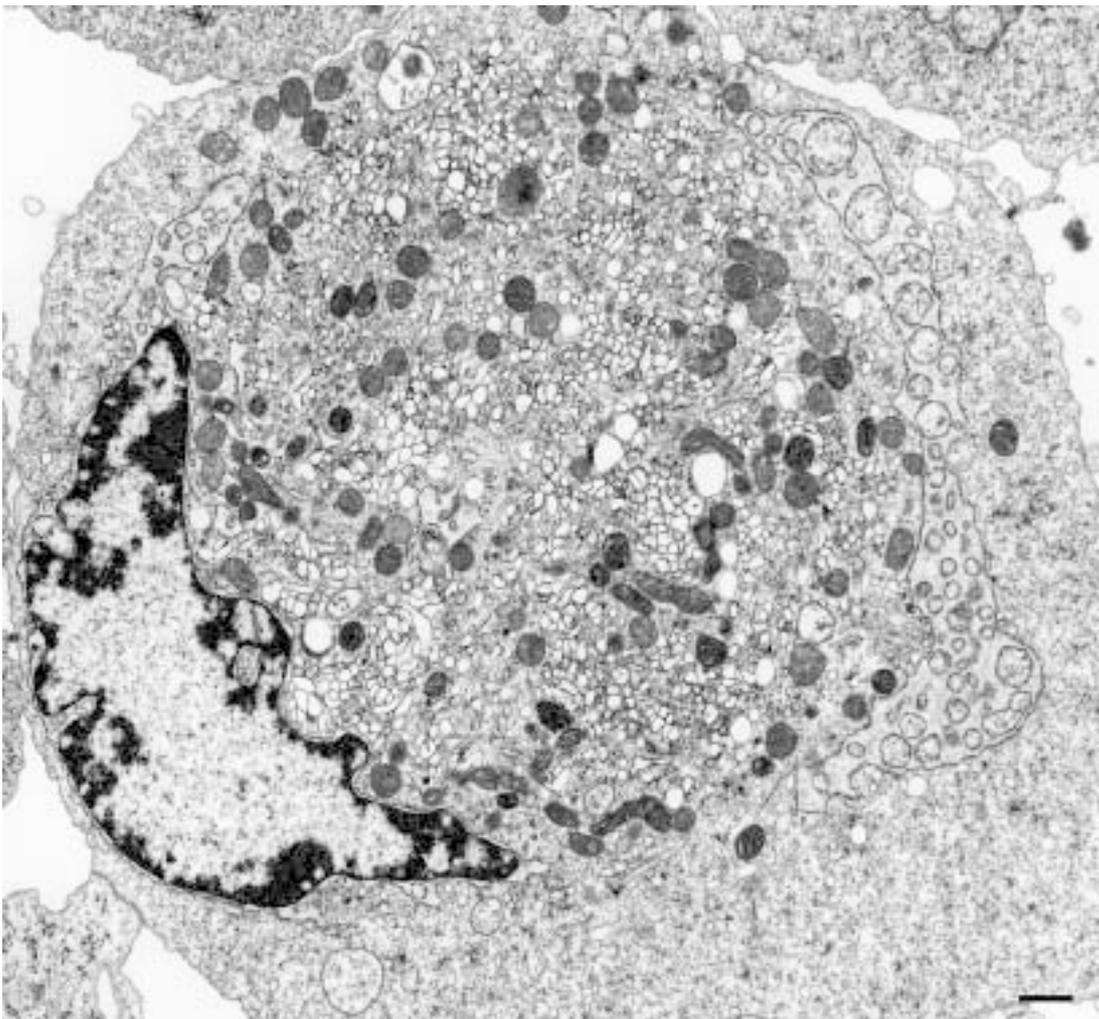


Abb. 8: Membranveränderungen in Poliovirus-infizierten Zellen. Elektronenmikroskopische Aufnahme einer HEp-2 Zelle 4.30 h nach der Infektion mit Poliovirus Mahoney1. Im zentralen Bereich des Zytoplasmas der infizierten Zelle ist ein großes Feld von Poliovirus-Vesikeln zu erkennen, das zur Verdrängung des Nukleus aus diesem Bereich führt. Die Poliovirus-Vesikel stellen den cytopathischen Effekt dar und führen zum Absterben der infizierten Zellen. Maßstab: 1 μ m. (Bild entnommen aus: Egger et al., 2001)

Poliovirus-Vesikel sind von einer einfachen Membran, also einer Lipiddoppelschicht, umgeben und eng miteinander assoziiert, sodaß es oft zu einer Fusion der Membranen benachbarter Vesikel kommt und sich daher zwischen diesen Vesikeln eine dreifache Membran anstelle der zwei ursprünglichen Lipiddoppelschichten bildet (Dales et al., 1965). Die Membranen der Poliovirus-Vesikel tragen keine Ribosomen, es kann also an ihnen keine Translation stattfinden. Weiterhin finden sich an den Poliovirus Vesikeln - im Gegensatz zu anderen intrazellulären Membranen - wenig Membranproteine. Abweichend von der Form der einfachen Membran der Poliovirus-Vesikel ist beobachtet worden, daß spät in der Infektion auch Doppelmembranvesikel vorkommen (Dales et al., 1965; Schlegel et al., 1996). Es wurde vermutet, daß sich diese Doppelmembranvesikel durch einen autophagischen Prozeß bilden, bei dem sich eine vorhandene Struktur mit einer Einfachmembran in sich selbst einstülpt und dadurch eine doppelte Membran bildet. Das führt dazu, daß sich im Innern dieser autophagischen Vesikel cytoplasmatisches Material befindet, sie lassen sich also im Elektronenmikroskop deutlich von den primären Poliovirus Vesikeln unterscheiden. Jedoch wurden in anderen Studien überwiegend Vesikel mit einfachen Membranen und nur in sehr seltenen Fällen Vesikel mit Doppelmembranen in PV-infizierten Zellen gefunden (Bienz et al., 1987; 1994), sodaß die Bildung der autophagischen Vesikel eventuell einen sekundären Prozeß darstellt.

Wird das Poliovirus-Protein 2BC alleine in Zellen exprimiert, führt dies zur Bildung von Vesikeln, die sich morphologisch (im Elektronenmikroskop) nicht von den Vesikeln der Poliovirus-Infektion unterscheiden (Bienz et al., 1990). Daher ist vermutet worden, daß das Protein 2BC durch einen bislang unbekanntem Mechanismus die Vesikelbildung induziert (siehe Kapitel 1.5. Das Poliovirus-Protein 2BC).

Die Poliovirus-Vesikel haben eine essentielle Funktion bei der Vermehrung des Virus. Der virale Replikationskomplex, in dem die Vermehrung des RNA-Genoms des Virus stattfindet (siehe Kapitel 1.3. RNA-Replikation), ist mit der Oberfläche der Vesikelmembranen assoziiert (Bienz et al., 1987). Es wurde durch hochauflösende autoradiographische Untersuchungen im Elektronenmikroskop gezeigt, daß an den Vesikelmembranen die Synthese der viralen RNA stattfindet (Bienz et al., 1987). Zellfraktionen, die neben den viralen Proteinen, und der viralen RNA auch zelluläre Membranen enthalten, können de novo neue Polioviren produzieren (Molla et al., 1991; Barton et al., 1995). Der Teilschritt der Replikation, für den die Anwesenheit der Vesikelmembranen notwendig ist, wurde als die Initiation der Plus-Strang RNA Synthese identifiziert (Egger et al., 1996). Zellfraktionierung und native Isolation der Poliovirus-Vesikel zeigte, daß an diesen Vesikeln RNA Synthese in vitro stattfinden kann. Poliovirus-Vesikel sind in komplexen Strukturen assoziiert, sogenannten „Rosetten“ (Abb. 9), die die replizierende RNA eng umschließen (Bienz et al., 1990; 1992; 1994). Selbst nach der Zellfraktionierung wurden diese Rosetten noch in intakter, funktioneller Form gefunden, was auf eine starke Wechselwirkung zwischen den beteiligten Faktoren schließen läßt. Die Dissoziation der Vesikel ist durch Kälte oder Erhöhung der Osmolarität

möglich, jedoch reassoziieren die Vesikel unter physiologischen Bedingungen spontan wieder zu Rosetten. Diese Versuche konnten ebenfalls zeigen, daß die kleinste Einheit zur Initiation der Plus-Strang Synthese ein einzelnes Poliovirus-Vesikel ist (Egger et al., 1996). Bis heute ist die genaue Funktion der Poliovirus-Vesikel in der viralen RNA-Replikation ungeklärt, jedoch wurde vermutet, daß dadurch Interaktionen mit dem uridylierten VPg (VPg-pUpU = PV-3B) für das Priming der RNA-Synthese zustande kommen können (Towner et al, 1998). Weiterhin wird angenommen, daß die Vesikel-Membranen das strukturelle Rückgrat des viralen Replikationskomplex bilden und somit eventuell dem Problem einer fehlenden RNA-Topoisomerase entgegenwirken. Die Vesikelmembranen könnten der RNA während der Replikation eine strukturelle Verankerung geben und daher das Problem des „Unwinding“, des Aufwindens der viralen RNA bei der Replikation, lösen (K. Bienz, persönliche Mitteilungen).

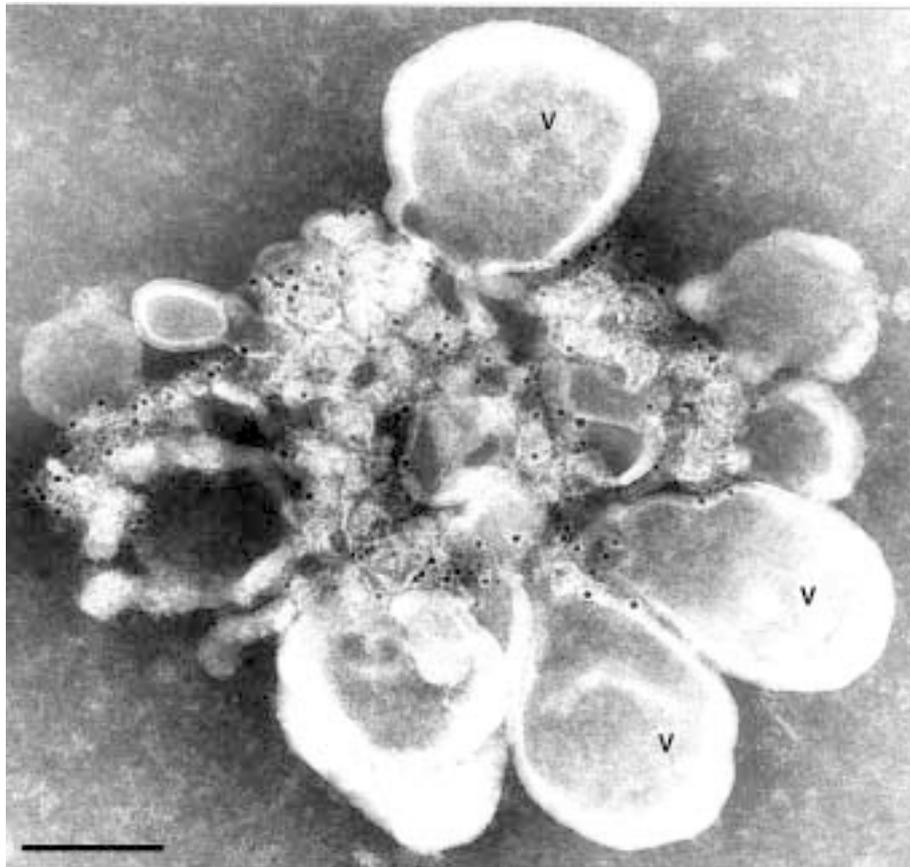


Abb. 9: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines von Poliovirus-Vesikeln umgebenen viralen Replikationskomplex. Poliovirus-Vesikel wurden durch Zellfraktionierung über Sucrosegradienten-Zentrifugation isoliert und nativ mit einem Antikörper gegen das PV-Protein 2C behandelt (5 nm Goldkörner). Die Poliovirus-Vesikel kommen in eng miteinander assoziierten Strukturen, sogenannten „Rosetten“, vor, die den viralen Replikationskomplex umschließen. Maßstab: 100 nm, V = Vesikel. (Bild entnommen aus: Bienz et al., 1992)

Im Poliovirus-Replikationskomplex finden sich alle viralen Nichtstrukturproteine sowie virale Plus- und Minus-Strang RNA (Egger et al., 2000). Mittels Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) konnte gezeigt werden, daß die virale Minus-Strang RNA in der Zelle immer mit der Plus-Strang RNA assoziiert ist (Bolten et al., 1998). Zusätzlich gibt es noch „freie“ Plus-Strang RNA, die nicht mit der Minus-Strang RNA assoziiert ist und wahrscheinlich auch nicht im Replikationskomplex lokalisiert ist. Das deutet darauf hin, daß die Plus-Strang RNA nach ihrer Synthese und vor der Verpackung in das Kapsid aus dem Replikationskomplex entlassen wird (Egger et al., 2000).

Die Nichtstrukturproteine 2B und 2C mit ihrem Vorläufer 2BC sind ausschließlich mit den Membranen der Poliovirus-Vesikel assoziiert, dabei sind für diese Interaktionen die amphipatischen Helices bzw. die hydrophoben Domänen dieser Proteine verantwortlich (Teterina et al., 1997; Egger et al., 2000).

1.5. Das Poliovirus-Protein 2BC

Die Proteine der Regionen P2 und P3 des Poliovirus-Genoms haben Funktionen bei der viralen RNA-Replikation, wie durch biochemische und morphologische Untersuchungen gezeigt werden konnte (Rueckert, 1996; Wimmer und Nomoto, 1993). Für den Aufbau des viralen Replikationskomplexes spielt das Precursor-Protein 2BC eine essentielle Rolle. Das Protein 2BC ist ein funktioneller Precursor von 48 kDa und wird durch die virale Protease 3C in die reifen Proteine 2B und 2C zerlegt. Obwohl bekannt ist, daß 2BC für die RNA-Replikation essentiell ist, ist der Mechanismus der 2BC-Funktion noch nicht verstanden. Bisher konnte gezeigt werden, daß 2BC in Hefe exprimiert Membranproliferation induziert, sowie die Exocytose blockiert (Barco und Carrasco, 1995). Verschiedene Mutationen in 2BC führten zu einem Block der viralen RNA-Synthese (Bernstein et al., 1986; Wimmer und Nomoto, 1993). Die alleinige Expression des 2BC Proteins in HeLa Zellen führt zur Akkumulation von Vesikeln im Cytoplasma von Zellen, die sich morphologisch nicht von Vesikeln in der Poliovirus-Infektion unterscheiden (Cho et al., 1994; Egger et al., 2000). Daher wurde 2BC oft als das poliovirale Protein bezeichnet, das die Vesikelbildung während der Infektion induzieren könnte (Aldabe und Carrasco, 1995; Bienz et al., 1983; Cho et al., 1994; Suhy et al., 2000; Teterina et al., 2001; Teterina et al., 1997).

Diese Vermutung wurde bestätigt durch Experimente, in denen die Abspaltung von 2BC aus dem viralen Polyprotein während der Reifung der Poliopeptide inhibiert wurde, wodurch die Bildung der Poliovirus-Vesikel verhindert wurde (Bienz et al., 1983). Jedoch war bislang unbekannt, ob 2BC selbst eine eigene Funktion zur Induktion oder Stimulation der Vesikelbildung besitzt, oder ob 2BC mit zellulären Faktoren interagiert um diesen Prozeß einzuleiten.

Das Poliovirus-Protein 2B

Das Poliovirus-Protein 2B ist mit nur 10 kDa das kleinere Spaltprodukt des Precursors 2BC. Es enthält eine Sequenz in seinem zentralen Teil, für die die Bildung einer amphipathischen Helix vorhergesagt wurde. Diese amphipathische Helix wurde ebenso für die 2B-Proteine weiterer Picornaviren bestätigt. Für das 2B des Coxsackievirus, das dem Protein 2B von Poliovirus ähnlich ist, wurde gezeigt, daß dessen amphipathische Helix zusammen mit einer hydrophoben Domäne in den Lipidbilayer zellulärer Membranen ragt und so Poren in diesen formen könnte (van Kuppefeld et al., 1996, 1997a, 1997b, 1997c). Das würde dazu führen, daß die Membranen „undicht“ werden und es ist entsprechend vermutet worden, daß diese Funktion eine Rolle bei der Freilassung neuer Viren spielen könnte. Das 2BC Protein der Picornaviren stellt also eventuell ein sogenanntes „Viroporin“ dar (van Kuppefeld et al., 1996, 1997a, 1997b, 1997c). Im Gegensatz dazu ist es bisher nicht gelungen, 2B oder 2BC in elektronenoptischen Untersuchungen an der Zellmembran zu detektieren, obwohl beide strikt membranbindende Proteine sind. Es konnte gezeigt werden, daß 2B eine Permeabilisierung der zellulären Membranen hervorrufen kann, was eine Erhöhung der Calciumkonzentration im Cytoplasma der Zelle zur Folge hat. Dies könnte ebenfalls zu der beschriebenen Undichtigkeit der Plasmamembran führen (Irurzun et al., 1995).

Sowohl 2BC als auch 2B konnten ausschließlich an den Membranen der Vesikel des Poliovirus-Replikationskomplexes nachgewiesen werden (Bienz et al., 1984, 1987; Egger et al., 1994; Schlegel et al., 1994). Daher war es möglich, diese Proteine als Marker für die Poliovirus-Vesikel zu definieren, weshalb schon in mehreren Studien Antikörper gegen PV-2B eingesetzt werden, um mit immunologischen Detektionsmethoden die Membranen der Poliovirus-Vesikel bzw. virale Replikationskomplexe in infizierten Zellen nachzuweisen (Bienz et al., 1987).

Die Bedeutung von 2B bei der viralen RNA-Synthese ergibt sich weiterhin aus Untersuchungen, die zeigen, daß verschiedene Mutationen in 2B zu nicht komplementierbaren, RNA-replikationsdefizienten Phänotypen führen (Bernstein et al., 1986). Diese Mutanten sind in einer Misch-Infektion dominant negativ über Wildtyp-Viren und zeigen Defekte in den frühen Phasen der RNA-Replikation (Johnson und Sarnow, 1991).

Das Poliovirus-Protein 2C

Das Poliovirus-Protein 2C hat eine Größe von 38 kDa und besteht aus 329 Aminosäuren. 2C gehört zu den am höchsten konservierten Proteinen bei den Picornaviren und ist ein multifunktionales Protein. Eine dieser Funktionen ist, daß 2C essentiell für die Replikation des picornaviralen Genoms ist (Schmidt und Wimmer, 1994), der Mechanismus dieser Funktion ist allerdings bisher nicht bekannt. Einige Hinweise deuten auf diese Schlüsselfunktion des 2C Proteins hin, so konnte gezeigt werden, daß 2C an den Membranen der Poliovirus-Vesikel lokalisiert ist, die den viralen Replikationskomplex umschließen (Bienz et al., 1990). Die Sequenz der Aminosäuren 1 bis 274 führte in Transfektionen in

in vitro zur Akkumulation von Vesikeln, die im Elektronenmikroskop nicht von denen der Poliovirus-Infektion zu unterscheiden waren (Teterina et al., 1997), jedoch führte die Expression des gesamten Proteins neben der Bildung von Poliovirus-Vesikeln zu einer geänderten tubulären Morphologie des ER (Teterina et al., 1997). Mutationen in 2C führten zu RNA-replikationsdefizienten Phänotypen des Virus, wie die Generierung temperatursensitiver Mutanten (Li und Baltimore, 1988) und Lethalmutanten im Bereich der aminoterminalen amphipathischen Helix (Paul et al., 1994) zeigte. Das Protein 2C, sowie sein Precursor 2BC sind mit der viralen RNA im Replikationskomplex assoziiert (Bienz et al., 1990) und für Sequenzen des N- und des C-Terminus wurden RNA-Bindungskapazität nachgewiesen (Rodriguez und Carrasco, 1993; 1995).

Da 2C weder stark hydrophobe Sequenzen noch Transmembrandomänen aufweist, wurde zunächst vermutet, daß es nicht direkt, sondern durch Protein-Protein-Interaktionen mit dem PV-Protein 3AB an Membranen bindet. Diese Vermutung wurde jedoch durch verschiedene Experimente widerlegt, in denen bei ausschließlicher Expression von 2C in Zellen dessen direkte Bindung an Membranen nachgewiesen wurde (Cho et al., 1994) und in vitro eine direkte Bindung von 2C an Microsomen-Membranen im Kaninchen-Retikulozyten-Lysat gezeigt wurde (Echeverri und Dasgupta, 1995). Später wurde die Bindungskapazität des Proteins in dessen N-terminalen und C-terminalen Bereichen lokalisiert (Teterina et al., 1997; Echeverri et al., 1998). Schon zuvor wurde für den Bereich der Aminosäuren 18 bis 35 nahe des N-Terminus des Proteins die Bildung einer amphipathischen Helix vorhergesagt (Paul et al., 1994).

In verschiedenen Arbeiten konnte für 2C eine NTP-Bindungskapazität (mit einer hohen Affinität zu ATP und GTP) gezeigt werden und in einem biochemischen Ansatz wurde nachgewiesen, daß 2C spezifisch ATP hydrolysiert (Pfister und Wimmer, 1999; Pfister et al., 2000). Die Bindung von 2C an Membranen wurde durch die Zugabe von 2 mM Guanidin-Hydrochlorid unterbunden, einer Substanz, für die gezeigt werden konnte, daß sie die RNA-Replikation von Poliovirus inhibiert. Mutationen, die zu einer Resistenz gegen Guanidin-HCl führten, konnten ausschließlich in der Region, die für 2C codiert lokalisiert werden (Pincus et al., 1986; Pincus und Wimmer, 1986). Mutationen in der NTP-Bindungsstelle von 2C verhindern ebenfalls die Replikation der viralen RNA (Mirzayan und Wimmer, 1992).

Daher wurde vermutet, daß durch die Behandlung mit Guanidin-HCl entweder die Bindung von 2C an die zellulären Membranen verhindert werden könnte (Bernstein et al., 1986; Bienz et al., 1990), oder die Konformationsänderung von 2C, die auf die Bindung von GTP folgt und zu dessen Hydrolyse führt, unterbunden wird (Rodriguez und Carrasco, 1993). Pfister und Wimmer konnten zeigen, daß die ATPase-Aktivität von 2C durch 2 mM Guanidin-Hydrochlorid inhibiert wird (Pfister und Wimmer, 1999). Ob jedoch ein Zusammenhang zwischen der ATPase-Aktivität von 2C und dem Aufbau des viralen Replikationskomplexes besteht, die ATPase-Aktivität also essentiell für die Bildung der Poliovirus-Vesikel in der Zelle ist, konnte bisher nicht gezeigt werden.

1.6. Der intrazelluläre Transport

Die große Anzahl biochemischer Prozesse kann nur zeitgleich in einer Zelle ablaufen, weil diese durch intrazelluläre Membransysteme in verschiedene Kompartimente eingeteilt ist, die wie getrennte Reaktionsräume funktionieren. Diese Kompartimentierung erfordert den Transport von Proteinen zwischen diesen einzelnen Reaktionsräumen, sowie eine kontrollierte Sortierung dieser Proteine. Der intrazelluläre Transport hat eine zentrale Bedeutung nicht nur bei der Verteilung, sondern auch bei der richtigen Sortierung der von der Zelle produzierten Proteine. So müssen alle neu synthetisierten Proteine über den intrazellulären Transport in der richtigen Menge zur richtigen Zeit und fertig modifiziert an ihren Bestimmungsort in der Zelle oder aus der Zelle heraus transportiert werden. Die gerichtete Zuordnung der Proteine ist eine zentrale Funktion der Organisation der Zelle und stellt einen regulierten Prozeß dar, über den aufgrund seiner Komplexität bisher nur ein beschränktes Wissen vorhanden ist. In den letzten Jahren sind allerdings große Fortschritte auf diesem Forschungsgebiet erzielt worden, sodaß heute die grundlegenden Mechanismen der Transportprozesse geklärt sind (Klumperman, 2000).

Der intrazelluläre Transport wird durch membranöse Strukturen bewerkstelligt, die in ihrer häufigsten Form als kleine Vesikel mit einer einfachen Lipiddoppelschicht vorkommen. Die Bildung dieser Vesikel folgt einem einheitlichen Grundprinzip, bei dem durch bestimmte, für die jeweiligen Zellorganellen charakteristische Proteine ein Abschnüren von Teilen der Membranen der Donororganellen stattfindet (Klumpermann, 2000). Die Fusion der Vesikel mit den Zielorganellen wird ebenfalls durch spezielle Proteine erreicht, die sich auf der Oberfläche der Vesikelmembranen befinden.

Die Proteine, die das Absprossen der Vesikel von den Organellen durchführen, werden als „Coat“-Proteine bezeichnet, da sie wie ein „Überzug“ auf der Oberfläche der Membranen binden, bevor diese zu Vesikelmembranen werden. Die Coat-Proteine sind charakteristisch für bestimmte Transportrouten und für die jeweiligen Donororganellen (Rothman, 1994). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Coat-Proteine ebenfalls in die Selektion der transportierten Proteine (Cargo) involviert sind (Campbell und Schekman, 1997; Aridor et al., 1998).

Für eine grobe, funktionsorientierte Einteilung der verschiedenen Transportprozesse wurde die Richtung der Transportintermediate in der Zelle herangezogen. Für die Funktionalität der Zelle ist der selektive Transport über zwei distinkte Transportrouten von zentraler Bedeutung. Der anterograde Transport nimmt seinen Weg von den Orten der Proteinsynthese (dem endoplasmatischen Retikulum) aus über zwischengelagerte Zellorganellen bis hin zur Peripherie der Zelle, also letztlich bis hin zur Plasmamembran. Durch den anterograden Transport werden neu synthetisierte Proteine vom ER zu ihrem Bestimmungsort transportiert und Membranmaterial für die nachgelagerten Organellen bereitgestellt. Sämtliche sekretorischen Proteine, sowie alle Proteine, die glykosiliert werden und alle Proteine, die in die Zellmembran integriert werden, folgen dem anterograden Transport (Klumperman,

2000). Der retrograde Transport hingegen ist für die Rückführung bestimmter Proteine sowie Membranmaterial von den peripheren Zellorganellen zum ER verantwortlich (Rothman et al., 1994). Beide Transportwege werden unter dem Begriff „secretory pathway“, also sekretorischer Transportweg zusammengefasst (Klumpermann, 2000). Der sekretorische Transportweg ist gekennzeichnet durch die Reihenfolge, in der die beteiligten Zellorganellen durchlaufen werden, beim anterograde Transport geschieht das nach folgendem Schema: ER => ER exit sites => Vesicular Tubular Clusters (VTCs) bzw. ER-Golgi-Intermediate Compartment (ERGIC) => cis Golgi => medial Golgi => trans Golgi mit trans Golgi network (TGN) => Plasmamembran.

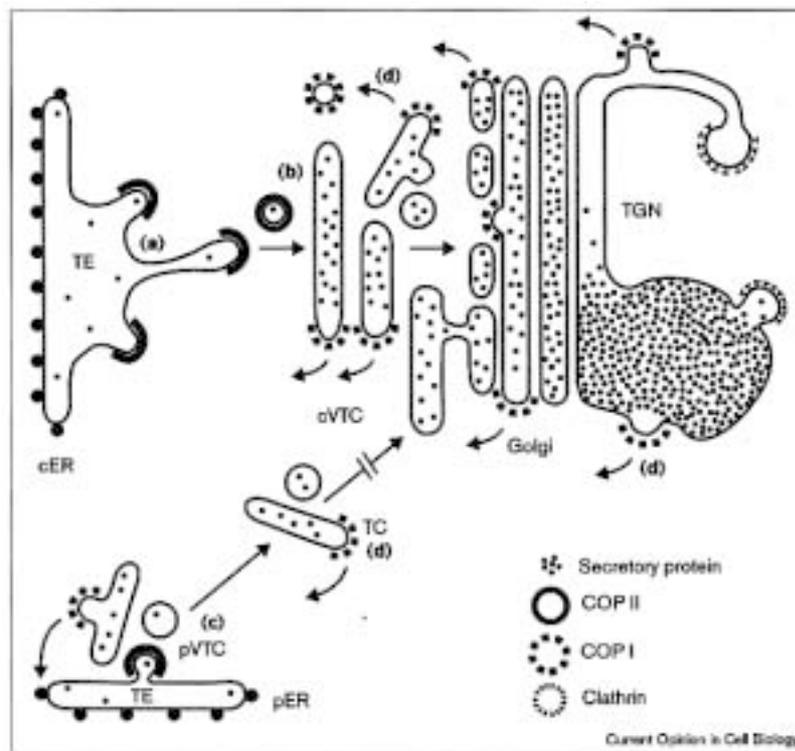


Abb. 10: Schema des zellulären sekretorischen Transportwegs. Nach der Synthese der sekretorischen Proteine am ER werden diese in den „transitional elements“ (TE) des ER konzentriert (a) und verlassen das ER in COPII-Vesikeln (b). Nachdem die COPII-Vesikel vom ER abgeschnürt wurden, verlieren sie die COPII-Proteine, fusionieren und formen die sogenannten VTCs („vesicular tubular clusters“). An diesen VTCs, die auch als ERGIC (ER Intermediate Compartment) bezeichnet werden, bildet sich COPI-Vesikel, die den anterograden Transport zum Golgi übernehmen. Es wird vermutet, daß die COPII-Vesikel vom peripheren ER (pER) zu tubulären Vesikeln geringerer Größe als die VTCs fusionieren und direkt an die Membranen des Golgi-Aparates binden (d). An den Membranen der VTCs und des Golgi werden COPI-Vesikel gebildet, die den retrograden Transport und die späten Stufen des anterograden Transports durchführen. Vom trans Golgi-Netzwerk (TGN) werden die sekretorischen Proteine entweder durch Clathrin-Vesikel an die Plasmamembran transportiert oder durch COPI-Vesikel auf dem retrograden Transportweg recycled. (Bild entnommen aus: Klumperman, 2000)

Im Folgenden werden die für den Transportprozeß und die Sortierung der Proteine essentiellen Intermediate bzw. Organellen detailliert beschrieben:

1.) Das ER

Am ER werden die sekretorischen Proteine synthetisiert, indem Ribosomen an den Membranen des ER binden und mit Hilfe weiterer Faktoren die Proteinbiosynthese durchführen. Dazu werden Membranproteine während der Synthese mit einem noch ungeklärten Mechanismus in die ER-Membranen inseriert und die löslichen Proteine durch eine spezielle Translokationmaschinerie in das Lumen des ER hineinsynthetisiert (Johnson et al., 1999). In den Membranen des ER gibt es spezialisierte Bereiche, an denen die Transportvesikel gebildet werden, die sogenannten „ER exit sites“, oder „ERES“. In den ER exit sites werden Proteine des ER konzentriert und durch einen Mechanismus (siehe unten) in die Transportvesikel verpackt. Innerhalb des ER sind eine Reihe von Kontrollmechanismen vorhanden, die es nur richtig gefalteten Proteinen erlauben, das ER zu verlassen. Für diese Qualitätskontrolle innerhalb des ER sind Proteine zuständig, die als Chaperone bezeichnet werden. Chaperone unterstützen die neu produzierten Proteine bei der Einnahme ihrer korrekten Faltung und erkennen ebenfalls falsch gefaltete Proteine. Solche fehlerhaften Proteine werden in speziellen Bereichen des ER konzentriert, um dort wieder degradiert zu werden. Vesikel des retrograden Transportweges können mit allen Teilen des ER fusionieren und bringen somit Proteine und Membranmaterial zurück zu allen Bereichen des ER. Retrograde Transportvesikel sind ebenfalls in die Qualitätskontrolle der Zelle involviert, da sie zum Beispiel Proteine, die fälschlicherweise aus dem ER heraus transportiert wurden, wieder zum ER zurückbringen. Diese Kombination aus Zurückhalten ER-ständiger Proteine („retention“) und Rücktransport fälschlicherweise aus dem ER entkommener Proteine („retrieval“) ermöglicht eine genaue Selektion des Proteinexports am ER (Nilsson und Warren, 1994; Sönnichsen, et al., 1994).

2.) ERGIC bzw. VTCs

Der Begriff ERGIC steht für „ER Golgi intermediate compartment“ (Schweizer et al., 1990). Das ERGIC stellt ein morphologisch definiertes Kompartiment zwischen ER und dem Golgi-Apparat dar und ist die erste „Sortierstation“ des anterograden Transports. Es besteht aus tubulär-vesikulären Strukturen, die in der Nähe der ERES liegen, hauptsächlich in der perinukleären Region des Cytoplasmas (Hauri et al., 2000). Die Entstehung des ERGIC wird derzeit kontrovers diskutiert, so wird angenommen, daß entweder alle anterograden Transportvesikel miteinander zum ERGIC fusionieren, oder das ERGIC ein stabiles Kompartiment ist, in dem die Transportvesikel aufgehen. In der Literatur gibt es einige Überschneidungen in der Bezeichnung bzw. Definition mit den sogenannten VTCs (Presley et al., 1997; Scales et al., 1997; Alvarez et al., 2000). VTC steht für „vesicular tubular clusters“ und umschreibt Transportintermediate zwischen dem ER und dem Golgi,

die morphologisch nicht weiter vom ERGIC abgegrenzt werden können (Balch et al., 1994). Da die Inhalte dieser beiden Bezeichnungen noch nicht geklärt werden konnten, bzw. es wahrscheinlich erscheint, daß diese Bezeichnungen die selbe Struktur beschreiben, soll in dieser Arbeit ausschließlich der Begriff ERGIC für das beschriebene stabile Kompartiment zwischen ER und Golgi verwendet werden. Der am besten definierte Marker für das ERGIC ist die Präsenz eines membranbindenden Proteins, des sogenannten ERGIC53 (Hauri et al., 2000). ERGIC53 ist ein Lektin (also ein nicht enzymatisch aktives, Zucker bindendes Protein), das im ERGIC Funktionen als Cargo-Rezeptor ausübt und damit eine Sortierung der transportierten Protein erlaubt (Hauri et al., 2000).

3.) Der Golgi-Apparat

Der Golgi-Apparat ist das Zellorganell, in dem der größte Teil der posttranslationalen Modifikationen der synthetisierten Proteine stattfindet. Das prominente Beispiel für diese Modifikationen ist die Bestückung der Proteine mit Zuckerresten, die sogenannte Glykosilierung. Der Golgi-Apparat besteht aus verschiedenen, „Zisternen“ genannten Untereinheiten, die längs nebeneinander im Cytoplasma, meist in der Nähe des Nukleus liegen. Man unterscheidet den cis-, mittleren, und den trans-Golgi, wobei der cis-Golgi den Ort der Fusion der anterograden Transportvesikel und der trans-Golgi den Ort der Bildung der exocytotischen Vesikel umfassen. Retrograde Transportvesikel, die zum ERGIC oder zum ER transportiert werden, können wahrscheinlich nur an der cis-Seite des Golgi gebildet werden (Klumperman, 2000). Von der cis- zur trans-Seite des Golgi durchlaufen die Proteine die verschiedenen Reifungsprozesse, allerdings ist bisher noch nicht geklärt, wie die Mechanismen dieser Prozesse funktionieren. Nach den zwei vorherrschenden Modellen könnte entweder die gleiche Zisterne während der Reifung der enthaltenen Proteine von der cis- zur trans-Seite des Golgi wechseln („cisternal progression model“), oder die Proteine in Transportintermediaten von Zisterne zu Zisterne transportiert werden („cisternal maturation model“) (Mironov et al., 1998; Orci et al., 2000). Sicher ist, daß in bestimmten Bereichen des Golgi charakteristische Proteine angereichert sind, die die Modifikation der sekretorischen Proteine übernehmen. Der Golgi ist also funktionell gegliedert (Melman und Simmons, 1992).

Anterograder Transport

Die Strukturen des zellulären Transports werden aufgrund ihres spezifischen Proteinbesatzes von anderen zellulären Kompartimenten unterschieden. Von den Membranen des ER werden die Container des anterograden Transports abgeschnürt, die mittels einem spezifischen Set im Cytoplasma gelöster Proteine gebildet werden. Diese Proteine bilden gemeinsam einen einheitlichen Coat auf den Membranen dieser, den sogenannten „COPII“-Coat (von „coat protein complex II“). Die Mehrzahl dieser Strukturen kommen in Form mit einer Einfachmembran umhüllter Vesikel von 70 nm bis 120 nm Durchmesser vor, die als COPII-Vesikel bezeichnet werden (Barlowe et al.,

1998). Es ist bis heute jedoch nicht eindeutig geklärt, ob diese COPII-positiven Strukturen ausschließlich in Form von Vesikeln vorkommen, oder ob es auch morphologisch davon abweichende COPII-tragende Container wie etwa Tubuli gibt, die Teile des anterograden Transports übernehmen. Mit einem VSV-G/GFP-Fusionsprotein konnten tubuläre Strukturen mikroskopisch nachgewiesen werden, die den anterograden Transport durchführen und deren Größe die eines COPII-Vesikels um ein Vielfaches übersteigt (Presley et al., 1997). Ferner ist bislang nicht geklärt, in welchen Strukturen Proteine, deren Größe die der Vesikel teils deutlich übersteigt (z.B. Procollagen mit ca. 300 nm, Bonfanti et al., 1998) zum Golgi transportiert werden. Es steht jedoch fest, daß die überwiegende Anzahl der Proteine und Membranen in kleinen Vesikeln transportiert werden, bis sie zum oder mit dem ERGIC / bzw. den VTCs fusionieren (Klumpermann, 2000).

Der COPII-Coat setzt sich aus fünf einzelnen Untereinheiten zusammen, die normalerweise gelöst im Cytoplasma vorkommen und bei Bildung eines Vesikels streng sequentiell an die ER exit sites binden, die auf den Export sekretorischer Proteine aus dem ER spezialisiert sind (Matsuoka et al., 1998). Die Mehrzahl der Coat-Proteine wurden in speziellen transportdefizienten Mutanten der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt. Diese Mutanten wurden nach der üblichen Nomenklatur der Hefe-Genetik als Sec-Mutanten (für „secretion defective“) bezeichnet, die dazugehörigen, betroffenen Proteine als Sec-Proteine (Kaiser und Schekman, 1990). Zur weiteren Aufklärung der Funktion des COPII-Coats und der Coat-Proteine diente ebenfalls *S. cerevisiae* als Modellorganismus, in dem ein zellfreies Rekonstitutionssystem des zellulären Transports daraus abgeleitet werden konnte (Baker et al., 1988).

Der COPII-Coat besteht aus den Proteinen Sar1p, Sec23p, Sec24p, Sec13p und Sec31p, von denen jedoch vier in Form zweier vorgeformter Komplexe im Cytoplasma vorkommen. Sec13 und Sec31 liegen im sogenannten Sec13-Komplex und Sec23 und Sec24 liegen als Sec23-Komplex vor (Barlowe, 1998). Barlowe et al. (1994) gelang es mit einem in vitro Rekonstitutionssystem zu zeigen, daß diese fünf Faktoren ausreichend sind, um die Bildung funktioneller COPII-Vesikel an Liposomen zu induzieren (Barlowe et al., 1994).

Komplex	Protein	Größe	Charakteristika
Sec23-Komplex	Sar1	21 kDa	GTPase
	Sec23p	85 kDa	GAP für Sar1
Sec13-Komplex	Sec24p	105 kDa	Cargo-Rezeptor
	Sec13p	34 kDa] stimulieren GTPase- Aktivität der Sar1
	Sec31p	150 kDa	

Tabelle 2: Bestandteile des zellulären COPII-Coat.

Die Bindung der COPII-Proteine erfolgt sequentiell, wobei die Präsenz des jeweils vorher bindenden Faktors eine Voraussetzung für die Bindung des nächsten Faktors ist. Dies konnte durch Rekonstitutions-Experimente gezeigt werden, in denen die einzelnen Faktoren in verschiedenen Reihenfolge zu den Liposomen gegeben wurden (Matsuoka et al., 1998). Zunächst bindet Sar1 an die Membranen des ER, wodurch die anschließende Rekrutierung des Sec23-Komplex ermöglicht wird. Die darauf folgende Bindung des Sec13-Komplexes an die ER-Membranen stellt den letzten Schritt der Vesikelbildung dar und führt direkt zum Absprossen der Vesikel.

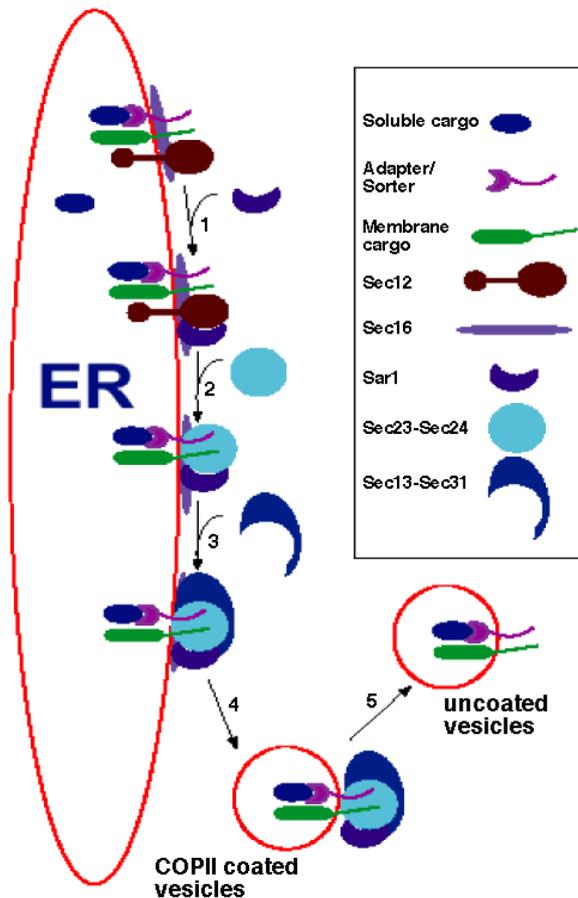


Abb. 11: Schema der Bildung der anterograden Transportvesikel. Am endoplasmatischen Retikulum (ER) werden anterograde Transportvesikel durch die sequentielle Rekrutierung der Proteine des COPII-Coat gebildet. Sar1 wird nach der Bindung von GTP an die Membranen des ER gebunden, an denen sich bereits Sec12 und Cargo-Proteine befinden (1). Dies ermöglicht die Bindung des Sec23-Komplex (2), die die Voraussetzung für die Rekrutierung der Proteine des Sec13-Komplex ist (3). Wenn der COPII-Coat vollständig an den Membranen der ER exit sites gebunden hat, werden die Vesikel durch einen bislang unbekanntem Mechanismus abgeschnürt (4) und verlieren danach rasch den COPII-Coat (5). (Bild entnommen aus: Hong, 1998)

Im ersten Schritt der Bildung eines COPII-Vesikels wird Sar1 ATP-abhängig an die ER-Membran gebunden. Dieser Schritt geschieht durch den Austausch von GDP zu GTP gebunden an Sar1 und wird durch ein mit den ER-Membranen assoziiertes Protein, das Sec12p (ein Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor, GEF) katalysiert (Campbell et al., 1997). Dieser Vorgang steht unter der Kontrolle einer spezifischen Proteinkinase, die bisher nicht näher charakterisiert werden konnte, sich jedoch spezifisch durch den Serin/Threonin-Kinaseinhibitor H89, ein Isoquinolinsulfonamid, inhibieren läßt (Aridor et al., 2000, Lee und Linstedt, 2000). Für die Aktivierung und Bindung von Sar1 an die ER-Membranen ist die Hydrolyse des GTP durch Sar1 nicht notwendig, weshalb stabile, nicht hydrolysierbare GTP-Analoga wie z.B. GMP-PNP oder GTP- γ S ebenfalls die Bildung von COPII-Vesikeln ermöglichen.

Nachdem das aktivierte Sar1 an der ERES gebunden hat, wird als nächstes der Sec23-Komplex rekrutiert. Es wird vermutet, daß bei diesem Schritt stimulierende Interaktionen mit Proteinen, die für den Transport bestimmt sind (Cargo-Proteine) stattfinden. Daher wurden diese Cargo-Proteine auch als „Primer“ der Vesikelbildung und die Gesamtheit dieser zuerst an die ERES bindenden Faktoren (Sar1p, Sec23p und Sec24p) als „Priming“-Komplexe bezeichnet (Springer et al., 1999). Es gibt Hinweise darauf, daß die Integration von Cargo-Proteinen hauptsächlich bei diesem Schritt der Vesikelbildung durch die Proteine des Sec23-Komplex durchgeführt wird. Demnach interagieren die Proteine des Sec23-Komplex nicht nur mit dem aktivierten Sar1, sondern ebenfalls mit Proteinen der Familie der p24-Cargo-Rezeptoren sowie direkt mit einigen Cargo-Proteinen (z.B. ERGIC-53; Glykoprotein des Vesiculären Stomatitis Virus, VSV-G) (Barlowe, 1998). Für den Sec23-Komplex wurde bereits gezeigt, daß dieser zwei solche Faktoren gleichzeitig binden kann, nämlich Sar1 und das vSNARE bet1 (zur Erklärung der SNAREs: siehe unten, Springer und Schekman, 1998). In Protein-Komplexen, die unmittelbar vor dem Abschnüren eines Vesikels von der ER-Membran auftreten, konnten neben den COPII-Proteinen ebenfalls Proteine der p24-Familie sowie verschiedene SNAREs (siehe unten) gefunden werden (Kuehn et al., 1998). Das auch die Cargo-Proteine einen Einfluß auf die Bildung von COPII-Vesikeln haben können, konnten Aridor et al. (1999) zeigen, indem sie nach Synchronisation der Bildung eines artifiziellen Cargo-Proteins (VSV-G) einen gleichzeitigen Anstieg der Bildung von COPII-Vesikeln nachweisen konnten (Aridor et al., 1999).

Die Präsenz der „Priming“-Komplexe aus Sar1 und Sec23-Komplex an den ER-Membranen hat zur Folge, daß der Sec13-Komplex an diese Teile der ER-Membranen bindet. Es wird vermutet, daß die Proteine Sec13 und Sec31 bei der Vesikelbildung die Funktion haben, die einzelnen Priming-Komplexe an den ER-Membranen zu vernetzen (Schekman und Orci, 1996) und somit das Vorwölben der ER-Membranen und das Absprossen der Vesikel zu induzieren (Springer und Schekman, 1998). Vermutlich werden die dafür notwendigen Protein-Protein-Interaktionen durch die geringen Distanzen der Proteine oder die Präsenz anderer Faktoren (z.B. Cargo-Proteinen) nur

nach Bindung an die ER-Membranen möglich und finden nicht statt, solange diese im Cytosol gelöst sind (Reinhard et al., 1999). Der Mechanismus des Abschnürens der Vesikelmembran von den Membranen des ER ist bis heute unbekannt (Hong, 1998). Sicher ist, daß für diesen Vorgang kein weiterer Faktor mehr benötigt wird (Matsuoka et al., 1998; Spang et al., 1998), da auch in Rekonstitutionsversuchen die vollständige Abschnürung der Vesikel stattfand ohne das weitere Faktoren zugegeben wurden. Es wurden jedoch zwei weitere Proteine gefunden, die eine bisher unbekannte Rolle bei der Bildung von COPII-Vesikeln einnehmen. Sec16p und Sed4 interagieren offenbar mit den Bestandteilen des COPII-Coats, sind jedoch für den Prozeß der Vesikelbildung nicht essentiell (Espenshade et al., 1995; Gimeno et al., 1995; Gimeno et al., 1996). Es wird vermutet, daß diese Proteine die COPII-Proteine bei der Bildung des Coats als Grundgerüst unterstützen (Barlowe, 1998). Die Interaktionen dieser Proteine mit dem sec23-Komplex spricht für eine Funktion dieser Proteine bei der selektiven Verpackung von Cargo-Proteinen während der Bildung der Transportvesikel (Hong, 1998). Diese Befunde sprechen für den schon früher propagierten selektiven Transport von Cargo-Proteinen im sekretorischen Transportweg. Die konträre Hypothese eines nicht selektiven Transports der Cargo-Proteine vom ER, bei der eine Selektivität ausschließlich sekundär über den Rücktransport von Proteinen des ER über den retrograden Transportweg erreicht würde, wird durch diese Ergebnisse nicht gestützt (Hong, 1998).

Durch den Einsatz verschiedener nicht hydrolysierbarer GTP-Analoga in Rekonstitutionsexperimenten konnte kürzlich gezeigt werden, daß sowohl der Aufbau, als auch die Dissoziation des COPII-Coat schnelle Prozesse sind (Antonny et al., 2001). Beim Aufbau des COPII-Coat ist der Austausch von GDP zu GTP und Sar1 der zeitlimitierende Schritt, die anschließende Rekrutierung des Sec23- und des Sec13-Komplexes erfolgt ohne Zeitverlust. Der Aufbau des gesamten COPII-Coats erfolgt in diesem System innerhalb von 2 sec. Die Dissoziation des COPII-Coats erfolgt unmittelbar nach der Bildung der Vesikel und findet innerhalb von 10 sec nach der Aktivierung des Sar1 statt. Die Dissoziation des COPII-Coat wird durch die GAP-Funktion (für „GTPase aktivierendes Protein“) des Sec23-Komplex induziert. Diese wird durch die folgende Bindung von Sec13/31-Komplexes 10-fach gesteigert (Antonny et al., 2001), der COPII-Coat hat also schon bei seiner sequentiellen Bildung eine intrinsische Instabilität.

Bei den mit nicht hydrolysierbaren GTP-Analoga gebildeten COPII-Vesikeln ist die spätere Spaltung des GTP nicht möglich, wodurch der COPII-Coat nicht mehr dissoziieren kann. Die Dissoziation des COPII-Coats ist die Voraussetzung für die spätere Fusion der Transportvesikel mit dem Golgi-Apparat. Mit Einsatz von GTP-Analoga ist es also möglich, experimentell den COPII-Coat zu stabilisieren und damit die anterograden Transportvesikel anzureichern (Barlowe et al., 1994).

Neben den Cargo-Proteinen werden spezielle Proteine während der Vesikelbildung in deren Membranen integriert, die für die Fusion der Vesikel mit ihrem Zielorganell essentiell sind, aber erst nach der Dissoziation des COPII-Coat aktiviert werden können. Diese vSNAREs genannten

Proteine (von „vesicular soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor“) interagieren hochspezifisch mit Bindungspartnern (tSNAREs, von „target SNAREs“) an den Zielorganellen (z.B. Golgi-Apparat) und ermöglichen über Protein-Protein-Interaktionen die Fusion der Membranen beider Organellen (Nichols und Pelham, 1998). Die vSNAREs bestimmen somit die Spezifität und den Zielort der Transportvesikel.

Kürzlich konnte ein Protein charakterisiert werden (YIP1a), das prädominant in den ER exit sites lokalisiert ist und dort mit dem COPII-Coat interagiert. Es wurde vermutet, daß YIP1 Funktionen bei der Konzentration bzw. dem Export der Cargo-Proteine einnimmt. Damit sind die ER exit sites erstmals nicht nur durch die Konzentration von Cargo-Proteinen und die temporäre Bindung der COPII-Komponenten beschrieben, sondern durch die Präsenz eines Proteins, das eine spezifische Funktion in diesen spezialisierten Membranbereichen des ER ausübt (Tang et al., 2001).

Proteine, die nicht schon zu Beginn der Vesikelbildung in den Bereichen der ERES lokalisiert waren, können entweder durch laterale Diffusion (bei Membranproteinen), oder durch Interaktionen mit Cargo-Rezeptoren während des Absprossens der Vesikel in die Membranbereiche der Vesikelbildung transportiert werden. Allerdings ist das Zeitfenster für diese Prozesse durch die beschriebene Kinetik der Bindungsreaktionen kurz, weshalb der größte Teil der Cargo-Proteine wahrscheinlich schon zu Beginn der Vesikelbildung in den ERES konzentriert wird.

Der Aufbau des COPII-Coat an den ERES ist also nicht nur für den Prozeß der Vesikelbildung an den Membranen des ER wichtig, sondern durch die Interaktionen der COPII-Proteine mit potenziellen Cargo-Proteinen wird auch die Spezifität der transportierten Proteine gewährleistet.

Retrograder Transport

Der retrograde Transport ist für verschiedene regulative Prozesse innerhalb des zellulären Transports verantwortlich. Durch die Vesikel des retrograden Transports wird sowohl Membranmaterial als auch Proteine in die vorgelagerten Organellen bis schlußendlich zurück zum ER transportiert. Damit ist der retrograde Transport für die Integrität dieser Organellen sowie deren Proteinzusammensetzung essentiell. Es werden sowohl fälschlich transportierte Proteine wieder in das Ursprungsorganell (meist das ER) zurücktransportiert („retrieval“), als auch später, z. B. im Golgi-Apparat modifizierte Proteine zu ihrem endgültigen Bestimmungsort gebracht. Weiterhin werden Proteine durch den retrograden Transport in bestimmten Organellen konzentriert (Rothman, 1994), dies spielt besonders im Golgi-Apparat eine entscheidende Rolle, da einige Enzyme nur in frühen Zisternen des cis-Golgi vorkommen.

Der Mechanismus des retrograden Transports wurde am Beispiel der Vesikelbildung am Golgi-Apparat genauer untersucht. Wie beim anterograden Transport, sind auch hier kleine Membranvesikel das wichtigste Medium des Transportes. Die retrograden Vesikel werden ebenfalls durch einen speziellen Protein-Coat gebildet, dessen Proteine sich deutlich von denen des COPII-Coats

unterscheiden. Der Mechanismus der Vesikelbildung folgt jedoch dem gleichen Grundschema wie die Bildung der COPII-Vesikel am ER. Da der Protein-Coat der retrograden Vesikel vor dem der anterograden Vesikel entdeckt wurde, wurde er als COPI-Coat bezeichnet (Balch et al., 1984).

Der COPI-Coat besteht aus acht Proteinen, von denen jedoch sieben als vorgeformter Komplex im Cytoplasma vorliegen, der als „Coatomer“ bezeichnet wird. Nach der Aktivierung der kleinen GTPase ARF1 bindet der Coatomer-Komplex als Ganzes an die Membranen des Golgi. Die Untereinheiten des Coatomer-Komplexes werden als α -, β -, β' -, γ -, ζ -, ϵ - und θ -COP bezeichnet und weisen spezielle Sequenzen für Protein-Protein-Interaktionen sowie Interaktionen mit Membranen auf (Lowe und Kreis, 1998). Die GTPase ARF1 wird bei der Vesikelbildung wie Sar1 bei COPII-Vesikeln durch den katalysierten Austausch von GDP zu GTP aktiviert. Der vorgeformte Coatomer-Komplex bindet anschließend an die Stellen der Membran, an denen das aktivierte ARF1 vorliegt und führt - analog zum COPII-Mechanismus - zur Vorwölbung der Membran und zum Absprossung der COPI-Vesikel. Anders als der COPII-Coat besitzt der COPI-Coat kein intrinsisches GAP für Sar1, daher dissoziiert der COPI-Coat nicht umgehend nach der Vesikelbildung (Antonny et al., 2001).

Die Bildung der COPI-Vesikel kommt hauptsächlich am Golgi-Apparat vor, wo sie für den retrograden Transport innerhalb des Golgi sowie vom Golgi zum ERGIC und zum ER verantwortlich sind. Der COPI-Coat wurde jedoch zusätzlich an anterograden Transportvesikeln gefunden, die für den Transport vom ERGIC zum Golgi verantwortlich sind. Aufgrund der schnellen Dissoziation des COPII-Coats nach der Bildung der anterograden Vesikel wurde vermutet, daß ein späterer Schritt beim Transport der anterograden Vesikel abhängig vom COPI-Coat ist (Klumperman, 2000). Wahrscheinlich handelt es sich bei diesem Schritt um die Bildung der Vesikel am ERGIC (Orci et al., 1997; Scales et al., 1997, Girod et al., 1999).

Zusätzlich zum COPI-abhängigen retrograden Transport wurde jedoch noch ein COPI-unabhängiger retrograder Transportweg entdeckt, mit dem z.B. das Shiga-Toxin vom Golgi zum ER transportiert wird. Dieser Transportweg funktioniert auch nach Inhibition des COPI-Mechanismus der Vesikel-Bildung durch Brefeldin A (BFA), konnte jedoch bisher noch nicht näher beschrieben werden (Girod et al., 1999). Es gilt als gesichert, daß die größte Teil des retrograden Transports durch die COPI-positiven Vesikel stattfindet (Orci et al., 1989).

1.7. Zielsetzung der Arbeit

Die in der Poliovirus-Infektion beobachtete Akkumulation der Poliovirus-Vesikel im Cytoplasma der infizierten Zellen ist die strukturelle Voraussetzung für den Aufbau des viralen Replikationskomplexes, weshalb ohne die Induktion der Vesikel die Replikation der viralen RNA nicht möglich ist. Die essentielle Rolle der Poliovirus-Vesikel bei der Replikation des viralen Genoms legt nahe, daß sich bei Poliovirus ein spezifischer Prozeß für die Bildung der dafür benötigten Vesikel entwickelt hat. Die Bildung eines membrangebundenen Replikationskomplex ermöglicht die Errichtung eines viralen Kompartiments in der Wirtszelle, in dem die Replikation von ausschließlich viraler RNA stattfindet. Für die Vermehrung des Virus ist es daher entscheidend, daß die Vesikel in großer Menge möglichst früh in der Infektion als Matrix für die Replikation zur Verfügung stehen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die frühen Prozesse bei der Entstehung des Replikationskomplexes von Poliovirus zu untersuchen. Zwar ist schon recht frühzeitig die zentrale Bedeutung der Poliovirus-Vesikel für die virale Replikation entdeckt worden, der Ursprung der Poliovirus-Vesikel sowie der Mechanismus ihrer Bildung konnten jedoch bisher nicht geklärt werden. In der Literatur gibt es widersprüchliche Hinweise auf einen möglichen Ursprung der Poliovirus-Vesikel, so wurden im Elektronenmikroskop Vesikel gefunden, an deren Membranen die PV-Proteine 2BC und 2B immunhistochemisch detektiert werden konnten und die im Kontakt mit dem ER standen. Dies wurde als Hinweis auf das ER als Ursprung der Poliovirus-Vesikel gewertet (Bienz et al., 1987). In Zellfraktionierungs-Experimenten wurden jedoch in den Poliovirus-Vesikel enthaltenen Fraktionen neben Markern des ER, auch Marker des Golgi-Apparats sowie der Lysosomen gefunden (Schlegel et al., 1996). Der Golgi-Apparat wurde in weiteren Publikationen häufig als möglicher Ursprung der Poliovirus-Vesikel diskutiert (Sandoval und Carrasco, 1997), was zusätzlich durch die inhibitorische Wirkung von Brefeldin A auf die Poliovirusreplikation erhärtet wurde (Maynell et al., 1992; Doedens et al., 1994; Sandoval und Carrasco, 1997). Brefeldin A inhibiert die Bildung von retrograden Transport-Vesikeln an den Golgi-Membranen und daraus wurde geschlossen, daß Poliovirus-Vesikel an den Membranen des Golgi-Apparats gebildet werden könnten (Sandoval und Carrasco, 1997; Doedens et al., 1994).

Die biochemischen und morphologischen Hinweise konnten bisher den Ursprung der Vesikelbildung nicht abschließend klären, besonders da zum Mechanismus der Vesikelbildung und -akkumulation bisher keine Daten in der Literatur vorlagen. Obwohl dafür bisher Beweise fehlten, ist häufig vermutet worden, daß das PV Protein 2BC die Vesikelbildung induzieren könnte (Aldabe und Carrasco, 1995; Bienz et al, 1983; Cho et al., 1994; Suhy et al., 2000; Teterina et al., 2001; Teterina et al., 1997). Dafür gibt es bisher lediglich einige Hinweise: 2BC hat eine hydrophobe Domäne, mit der es in Membranen inserieren kann. Es wurden bei alleiniger Expression von 2BC im Elektronenmikroskop Vesikel gefunden, die sich morphologisch nicht von den Vesikeln der

Polioinfektion unterscheiden liessen (Egger et al., 2000). Das PV Protein 2BC wurde in der PV-Infektion ausschließlich assoziiert mit den Membranen der PV-Vesikel gefunden (Bienz et al., 1984, 1987; Egger et al., 1994; Schlegel et al., 1994).

Aufgrund ihrer zentralen Bedeutung für die Vermehrung des Poliovirus wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl der Ursprung der PV-Vesikel als auch der Mechanismus ihrer Bildung während der Infektion untersucht. Dazu kamen vor allem Immunfluoreszenz-Analysen und verschiedene mikroskopische Techniken sowie eine computergestützte Methode zur Optimierung konfokalmikroskopischer Bilder - die sogenannte Dekonvolution - zur Anwendung, die mit hoher Auflösung die Darstellung einzelner Vesikel in infizierten Zellen erlauben, aber auch durch Immunmarkierung die Detektion auf Vesikeln und Zellorganellen vorhandener Proteine ermöglichen. Dazu wurden die Ergebnisse der Elektronenmikroskopie mit denen von 3D-Rekonstruktionen dekonvolierter Bildserien aus dem konfokalen Mikroskop verglichen. Die dabei eingesetzte Fluoreszenzmarkierung von Proteinen des ER, des Golgi-Apparats, anterograder und retrograder Vesikel sowie weiterer zellulärer Transportintermediate ermöglichten die Detektion von zellulären Proteinen auf den Membranen der Poliovirus-Vesikel und daher die Analyse der Herkunft und des Bildungsmechanismus dieser Vesikel in der Infektion.

2. Material und Methoden

2.1. Zellkultur

Verwendete Zelllinien

BT7-H

BT7-H ist eine permanente, epitheliale Zelllinie, die aus der Niere von Afrikanischen grünen Meerkatzen (*Cercopithecus aethiops*) isoliert wurde (Whetter et al. 1994). BT7-H Zellen stammen von der Zelllinie BSC-1 ab und unterscheiden sich von dieser durch die stabile Transfektion mit dem Plasmid pOS2 (Whetter et al., 1994), das für die DNA-abhängige RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 codiert. Durch die Expression der T7-Polymerase können Proteine in diesen Zellen exprimiert werden, deren DNA unter der Kontrolle des T7-Promotors auf einem Plasmid in die Zellen transfiziert werden. Das Plasmid pOS2 codiert weiterhin für ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Geneticin (G-418 Sulfat, Gibco BRL / Life Technologies, Paisley, Schottland), das auf nicht resistente eukaryotische Zellen lethal wirkt (Whetter et al., 1994). Das bedeutet, dass in der Anwesenheit des Selektionsmarkers Geneticin im Kulturmedium nur Zellen überleben, die das Plasmid pOS2 mit den Genen der Geneticin-Resistenz und der T7-Polymerase enthalten und exprimieren.

BT7-H Zellen wurden gezüchtet in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM, Seromed / Oxoid, Basel, Schweiz), das mit 8% fötalem Kälberserum (FKS) und 500 µg/ml Geneticin versetzt wurde.

HeLa

HeLa-Zellen sind humane epitheliale Krebszellen, die im Jahre 1951 aus dem Cervixepithel der amerikanischen Patientin Helen Lang isoliert wurden. HeLa-Zellen waren die ersten epithelialen Zellen, die kontinuierlich kultiviert wurden und sind mittlerweile als Standardzelllinie in Labors auf der ganzen Welt verbreitet und bieten daher trotz der inzwischen deutlichen Unterschiede durch verschiedene Mutationen eine gute Grundlage, Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen und experimenteller Systeme zu vergleichen. In dieser Arbeit wurden HeLa-Zellen verwendet, die von Dr. Natalya Teterina (National Institutes of Health, Bethesda, PA, USA) zur Verfügung gestellt wurden. HeLa-Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) gezüchtet, das mit 8% FKS versetzt wurde.

Weitere in dieser Arbeit verwendete Zelllinien hatten nur eine untergeordnete Bedeutung für die vorliegende Arbeit und werden daher nicht näher beschrieben. Dabei handelte es sich um die folgenden Zelllinien:

- FRHK-4 (Nierenzellen des Rhesusaffen *Macaca mulatta*) zur Verfügung gestellt von Dr. Stanley Lemon, Galveston, Texas, USA)
- BS-C-1 (Nierenzellen der afrikanischen grünen Meerkatze, *Cercopithecus aethiops*, zur Verfügung gestellt von Dr. Stanley Lemon, Galveston, Texas, USA)
- CV-1 (Nierenzellen der afrikanischen grünen Meerkatze, *Cercopithecus aethiops*, zur Verfügung gestellt von Dr. R. Wittek, Genf, Schweiz)
- Hep-2 (humane epidermale Larynx-Karzinomzellen, zur Verfügung gestellt von Dr. V. Hamparian, Colombos, Ohio, USA)

Kultivierung der Zellen

Alle Zelllinien wurden als Monolayer-Kulturen, also als einschichtiger Zellrasen, bei 37°C in einem CO₂-Inkubator zur Pufferung des pH-Werts des Mediums kultiviert. Zum Umsetzen der Zellen in einer sterilen Werkbank wurde das Enzym Trypsin (Biochrom KG, Berlin) verwendet, durch das die Zellen der Monolayerkultur von ihrer Unterlage abgelöst werden, durch das jedoch bei kurzen Inkubationszeiten und anschließender Inaktivierung durch FKS die Zellen nicht geschädigt werden. Zum Umsetzen wurde die Monolayer-Zellkultur für je 30 sec mit 3 ml Trypsin bei

37°C inkubiert und das Trypsin anschließend möglichst vollständig abgenommen. Nun wurden die Zellkulturen bis zum Ablösen des Zellrasens vom Boden der Zellkulturflasche bei 37°C im CO₂-Inkubator aufbewahrt und anschließend in je 6 ml des entsprechenden Mediums aufgenommen. Die suspendierten BT7-H Zellen wurden je nach Zelldichte zwischen 1:4 und 1:9 verdünnt in 6 ml DMEM mit 8% FKS und 500 µg/ml Geneticin überführt und im CO₂-Inkubator bei 37°C kultiviert. Mit der HeLa-Zellkultur wurde entsprechend verfahren, jedoch wurde für diese kein Geneticin als Resistenzmarker verwendet.

Aufbewahrung der Zellen in flüssigem Stickstoff

BT7-H Zellen wurden über längere Zeit gefroren in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Dazu wurden die Zellen der Monolayer-Kulturen so umgesetzt, daß sie als eintägige Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase waren, aber trotzdem schon zu über 80% konfluierend waren. Die Zellen einer Kulturflasche wurden mit Trypsin vom Untergrund abgelöst und in je 2 ml Medium mit 7% DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma, Buchs, Schweiz) aufgenommen, vorsichtig suspendiert und in eine Cryoampulle überführt. Das Einfrieren geschah mittels des Linde BF-5-Systems (Union Carbide, New York, USA) durch Inkubation von je 8 Cryoampullen in Ring „F“ für 160 min in der Dampfatosphäre über dem flüssigen Stickstoff. Anschließend wurden die Ampullen mit den gefrorenen Zellen direkt in den flüssigen Stickstoff überführt. Die so eingefrorenen Zellen können von einigen Tagen bis zu Jahren oder sogar Jahrzehnten im flüssigen Stickstoff aufbewahrt werden. Zur Reaktivierung wurden die Zellen aufgetaut, indem die Cryoampullen direkt in Wasser mit 37°C überführt wurden. Dort wurden sie unter leichtem Schütteln inkubiert, bis die Kultur gerade eben aufgetaut war. Anschließend wurden die Zellen in je 5 ml DMEM-Medium mit 8% FKS aufgenommen und ohne sie zu resuspendieren in einer Zellkulturschale bei 37°C angesetzt. Nach ca. 6 h Inkubation bei 37°C, wenn sich die Zellen abgesetzt hatten, wurde das Medium gegen 5 ml auf 37°C vorgewärmtes DMEM mit 8% FKS und 500 µg/ml Geneticin ausgetauscht um Reste des DMSO zu eliminieren.

Medien für die Zellkultur

BT7-H Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) gezüchtet, dem 8% FKS zugesetzt wurde. Weiterhin wurde das Medium zur Erhaltung der stabilen Transfektion mit dem Plasmid OS2, 500 µg/ml Geneticin (G-418) zugesetzt.

Die Zusammensetzung des DMEM entsprach den allgemeinen Vorgaben für dieses Medium (Dulbecco und Freeman, 1959). HeLa-Zellen wurden ebenfalls in Dulbecco's Modified Eagle Medium gehalten, jedoch wurde diesem neben 8% FKS zusätzlich 1,3% Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃) zugegeben. Die weitere Zusammensetzung des Mediums ist identisch mit dem für die Kultivierung der BT7-H-Zellen beschriebenen DMEM.

2.2. Infektion und Transfektion

Vewendete Virusstämme

Für die Infektionen der Zellkulturen wurde hauptsächlich der Impfstamm der oralen Polioimpfung, der Poliovirus-Stamm Sabin1 LSC2ab/3 verwendet. Die Virussuspension hatte einen Titer von $1,6 \times 10^9$ PFU/ml.

Für die Untersuchung der Morphologie der Poliovirus-Vesikel wurde außerdem der Wildtyp des Serotyps 1 des Poliovirus, der Stamm Mahoney1 eingesetzt. Die Virussuspension von Mahoney1 hatte einen Titer von $1,4 \times 10^{10}$ PFU/ml.

Für die Transfektion des Plasmids pTM-2A-GFP(GFLV) wurden HeLa Zellen mit dem rekombinanten Vaccinia-Virus VTF7-3 infiziert (Fuerst et al., 1986). Das Virus hatte einen Titer von 1×10^{10} PFU/ml.

Infektion der Zellkulturen mit Poliovirus

Zur Infektion der Zellkulturen mit Poliovirus wurden sowohl Poliovirus Mahoney1, der Wildtyp des Serotyps 1, als auch der attenuierte Poliovirus-Stamm Sabin1 verwendet. Das Prozedere der Infektion war für beide Virusstämme in der vorliegenden Arbeit gleich.

Die verwendete Suspension des Poliovirus Sabin1 aus Zellkulturüberstand hatte einen Titer von $1,6 \times 10^9$ PFU/ml (für „plaque forming units“ pro ml). Das bedeutet, daß bei der Herstellung der Virus-Suspension aus Zellkulturüberstand in einem Milliliter der Suspension $1,6 \times 10^9$ infektiöse (also auf der Zellkultur Plaques induzierende) Viren vorhanden waren. Um bei den Versuchen eine möglichst vollständige und synchrone Infektion zu gewährleisten wurde mit einem Wert von ca. 200 Viren pro Zelle infiziert, also eine „MOI“ (von „multiplicity of infection“) von 200 eingesetzt. Die durchschnittliche Zahl der BT7-H Zellen in Monolayer-Kultur pro verwendeter Zellkulturschale mit 3,5 cm Durchmesser betrug $3,2 \times 10^5$ Zellen, daraus errechnete sich ein Bedarf von 40 µl der Virussuspension pro Zellkulturschale für die Infektion.

Die Infektion wurde wie im Folgenden beschrieben durchgeführt: Die Zellen wurden als eintägige Kultur angesetzt, sodaß sie bis zu 80% Konfluenz wachsen konnten. Zu Beginn der Infektion wurde das Medium vollständig von den Zellen abgenommen und umgehend durch 2 ml DMEM ohne FKS ersetzt. Das Medium wurde anschließend nochmals mit je 2 ml DMEM ohne FKS gespült und dieses anschließend vollständig von den Zellen abgesaugt. Für die Inkubation mit dem Virus wurden nun 600 µl Medium ohne FKS mit einer Temperatur von 37°C auf die Zellen gegeben, sodaß die Schicht der Zellen gerade eben mit Medium bedeckt war. Nach der Zugabe von 40 µl Virus-Suspension wurden die Kulturen in den ersten Versuchen der vorliegenden Arbeit direkt auf 37°C transferiert und bei gelegentlichem Bewegen der Zellkulturschale zur Verteilung des Virus bei dieser Temperatur bis zur Fixierung bzw. Probenahme belassen. Zur Synchronisierung der Infektion, wurde ein entsprechend abgeändertes Protokoll für die Infektion verwendet (siehe Kapitel „Ergebnisse“). Dabei wurde die eintägige Zellkultur im ersten Schritt ebenfalls zweimal mit DMEM ohne FKS gewaschen, wobei das Medium jedoch zuvor auf 0°C gekühlt worden war. Die Zellen wurden dann auf Eis transferiert und mit je 600 µl DMEM ohne FKS bei 0°C überschichtet. Nach Zugabe von 40 µl Virussuspension (0°C) wurden die Zellen für 45 min im Kühlraum auf Eis gehalten. Dabei wurden die Zellkulturschalen alle 5 min vorsichtig bewegt, sodaß möglichst viele Viren an die Zellen adsorbieren konnten. Nach der Adsorption des Virus wurden die Zellen zweimal mit je 2 ml DMEM mit 8% FKS gewaschen um nicht an die Zellen adsorbiertes Virus zu entfernen. Anschließend wurden je 2 ml vorgewärmtes DMEM (37°C) auf die Zellen gegeben und diese bis zur Probenahme bei 37°C im CO₂-Inkubator inkubiert. Der Transfer der Zellen auf 37°C wurde als Beginn der Infektion (Zeitpunkt 0) definiert.

Transfektion durch Lipofectin

Die Verwendung von Lipofectin (Gibco BRL / Life Technologies, Paisley, Schottland) ist - neben anderen Möglichkeiten - eine Methode zum Einschleusen fremder DNA oder RNA in eukaryotische Zellen. Lipofectin ist ein lipidreiches Agens, das in der vorliegenden Arbeit zur transienten Transfektion von verschiedenen DNA-Konstrukten verwendet wurde. Es bildet unter definierten Bedingungen Micellen, die eine zugegebene DNA einschließen und die mit der Plasmamembran einer zu transfizierenden Zelle fusionieren können. Auf diesem Weg gelangt die in den Micellen enthaltene DNA in das Cytoplasma der Zelle, wo sie zunächst transkribiert (also in RNA übertragen) und weiter translatiert (also in Proteine übersetzt) werden kann. Allerdings kann nicht jede DNA auf diese Weise in einer Zelle exprimiert werden, denn die zellulären RNA-Polymerasen befinden sich ausschließlich innerhalb des Nukleus bzw. in einigen Organellen, aber nicht im Cytoplasma. Normalerweise wird dieses experimentelle Problem gelöst, indem gleichzeitig mit der Transfektion der DNA eine Infektion mit einem rekombinanten Vaccinia-Virus (vTF7-3) durchgeführt wird, das das Gen für die RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 exprimiert (Fuerst et al., 1986). Diese T7-Polymerase transkribiert alle DNAs, die unter der Kontrolle eines T7-Promotors stehen. Dieser T7-Promotor

ist in den meisten Plasmiden, die zur DNA-Transfektion verwendet werden, vor dem zu exprimierenden Gen inseriert. Die Infektion mit dem rekombinanten Vaccinia-Virus kann jedoch zu Artefakten führen, da es einen cytopathischen Effekt in den infizierten Zellen induziert. Das Vorgehen bei der Transfektion des Plasmids 2A-GFP(GFLV) mit der Infektion des Vaccinia-Virus vTF7-3 wird im nächsten Abschnitt beschrieben. In diesem Zusammenhang bewährte sich die eingesetzte Zelllinie BT7-H die zur Transfektion nicht mit vTF7-3 infiziert werden mußte, da sie stabil mit dem Plasmid pOS2 transfiziert ist und unter Anwesenheit von Geniticin ständig die T7-RNA-Polymerase exprimiert (Whetter et al., 1994). Die stabile Transfektion mit dem Plasmid pOS2 verursachte keine pathologischen Effekte in den BT7-H Zellen (Whetter et al., 1994).

Für die Transfektion mit Lipofektin wurden die Zellen so umgesetzt, daß sie am Tag ihrer Verwendung als eintägige Kultur maximal 70% konfluent waren, da die Transfektionseffizienz in dieser Phase am höchsten war (D. Egger und K. Bienz, persönliche Mitteilungen). Vor der Transfektion wurde das Lipofektin, das normalerweise bei 4°C aufbewahrt wird, für mindestens 30 min bei Raumtemperatur inkubiert um die Micellenbildung zu stimulieren. Pro transfizierter 3,5 cm-Zellkulturschale wurden 25 µl Lipofectin zunächst in 75 µl sterilem und destiliertem H₂O aufgenommen. Dabei wurde diese Mischung ausschließlich in Polystyren-Gefäßen (Greiner, Frickenhausen, Schweiz) aufbewahrt, da nur dieses Material nicht mit der Micellenbildung des Lipofectins interferiert. In einem separaten Gefäß wurden nun 10 µg der zu transfizierenden DNA mit 50 µl sterilem destiliertem H₂O gelöst. Die gelöste DNA wurde anschließend in die Lipofectin-Lösung gegeben und beides zur Micellenbildung für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit DMEM-Medium ohne FKS bei 37°C gewaschen, anschließend wurde alles Medium von den Zellen abgenommen. Die Lipofectin-DNA-Lösung wurde nun auf die Zellen gegeben und bei 37°C für 60 min unter regelmäßigen, langsamen Bewegungen inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde den Zellen 1 ml DMEM ohne FKS zugegeben und die Zellen für 3 Stunden im CO₂-Inkubator belassen. Dann wurde das Medium von den Zellen abgenommen und durch DMEM-Medium mit 8% FKS ersetzt und die Zellen weiter bei 37°C inkubiert. Sechs bis achtzehn Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für die Immunfluoreszenzanalyse fixiert oder für die Elektronenmikroskopie eingebettet.

Transfektion durch Lipofectin und Infektion des Vaccinia-Virus VTF7-3

Für die Transfektion des Plasmids pTM 2A-GFP(GFLV) in HeLa Zellen durch Lipofectin wurden diese zusätzlich mit dem rekombinanten Vaccinia-Virus vTF7-3 infiziert, das das Gen für die T7-RNA-Polymerase trägt (siehe vorheriger Abschnitt). Dazu wurden das Lipofectin und die zu transfizierende DNA - wie im vorherigen Abschnitt beschrieben - vorbereitet. Nach dem Inkubationsschritt des Lipofectins mit der DNA, wurde diesen 150 µl DNA-Lipofektin-Lösung jedoch die wie folgt vorbereitete Vaccinia-Virus suspension zugegeben. Die Stocklösung des Vaccinia-Virus wurde nach dem Auftauen drei Mal für ca. 5 sec in Eiswasser mit Ultraschall behandelt, um Aggregate des Virus aufzubrechen. Der Titer der verwendeten vTF7-3 Suspension war 1x10 hoch 10. Da in der verwendeten HeLa-Zellkultur 6 x 10⁵ Zellen pro 3,5 cm-Zellkulturschale vorhanden waren und mit einer MOI von 10 PFU/Zelle infiziert werden sollte, wurden pro Zellkulturschale 0,6 µl vTF7-3-Virus zu 0,5 ml DMEM ohne FKS gegeben und dieses gut vermischt. Das Medium mit dem Vaccinia-Virus wurde anschließend zur vorbereiteten Lipofectin-DNA-Mischung gegeben und weiter wie bei der Lipofectin-Transfektion beschrieben verfahren. Aufgrund des cytopathischen Effekts der Infektion mit dem Vaccinia-Virus vTF7-3 wurden die so transfizierten und infizierten Zellen spätestens nach 18 Stunden fixiert.

Transfizierte Plasmide

Plasmid pTM-PV2BC-AA

Für die Herstellung des Plasmids pTM-PV2BC-AA durch Cho et al. (1994) wurde der Poliovirus cDNA-Klon pT7-PV1 verwendet, der erstmals von Charini et al. (1991) publiziert wurde. Die Sequenz des 2BC-Proteins wurde aus dieser

PV-cDNA ausgeschnitten und nach einen Zwischenschritt über den Vektor pGEM-3 in das Plasmid pTM-1 (Moss et al., 1990) umkloniert. Das Plasmid pTM-1 enthält die Sequenzen eines Ampicilin-Resistenzgens, einer EMCV-IRES zur Translationsinitiation sowie eines T7-Promotors vor der Insertionsstelle des zu exprimierenden Gens. Das 2BC-Protein von Poliovirus kann also durch Transfektion dieses Plasmids in einer Zelle exprimiert werden, die ebenfalls T7-RNA-Polymerase exprimiert. An die Sequenz des PV2BC wurde nachträglich durch Natalya Teterina (NIH, Bethesda, PA, USA) ein Poly-A-Schwanz angehängt, der die Stabilität der RNA in der Zelle erhöhte und damit zu einer gesteigerten Expression des Proteins führte.

Plasmid pE5PVΔP1

Das Plasmid pE5PVΔP1 codiert für den gesamten ORF des Poliovirus außer der Region der Kapsid-Proteine (P1), enthält also alle Nichtstrukturproteine, die gesamte 3'NTR und den Poly A-Schwanz des viralen Genoms (Teterina et al., 2001). Dieses Plasmid wurde aus dem Ursprungsplasmid pT7-PV1 (Haller und Semler, 1992) durch Teterina et al. (2001) hergestellt, indem der Bereich der 5'-NTR der Poliovirus-Sequenz durch die Sequenz des EMCV ausgetauscht wurde, dessen IRES eine effizientere Translationsinitiation ermöglicht, als die IRES des Poliovirus. Dadurch waren neben der IRES auch das Clover leaf der Poliovirus-Sequenz nicht mehr im Plasmid vorhanden. Da die Struktur des Clover leaf für die Initiation der RNA-Replikation des Poliovirus essentiell ist, ist die vom Plasmid gebildete RNA replikationsdefizient, obwohl von dieser alle viralen Nichtstrukturproteine exprimiert werden (Teterina et al., 2001). Wie beim Plasmid pTM-PV2BC-AA auch, war der beschriebene ORF vor einem T7-Promotor insertiert, durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase des Phagen T7 konnte dadurch also eine RNA in den transfizierten Zellen synthetisiert werden. Für das Plasmid pE5PVΔP1 konnte zuvor gezeigt werden, daß alle PV-Proteine der P2 und P3-Region vollständig exprimiert und richtig prozessiert werden, aber keine Replikation der pE5PVΔP1-RNA stattfinden konnte (Teterina et al., 2001). Entsprechend konnte gezeigt werden, daß durch die Transfektion von HeLa Zellen die gleichen Membranveränderungen induziert wurden, wie in Poliovirus-infizierten Zellen (Egger et al., 2000; Teterina et al., 2001).

Plasmid pTM-2A-GFP(GFLV)

Das Plasmid pTM-2A-GFP(GFLV) wurde von F. Gaire (Institut de Biologie Moleculaire des Plantes du CNRS, Strassbourg, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Das Protein 2A des mit den Picornaviren verwandten Grapevine Fanleaf Virus (GFLV) ist in die RNA-Replikation dieser Pflanzenviren involviert (Gaire et al., 1999) und induziert wahrscheinlich Membranveränderungen in den Wirtszellen (F. Gaire, persönliche Mitteilung). In elektronenmikroskopischen Studien konnte 2A-GFLV ausschließlich an den Membranen des ER nachgewiesen werden (F. Gaire, persönliche Mitteilung). Das Plasmid pTM-2A-GFP(GFLV) wurde hergestellt, indem aus dem entsprechenden Pflanzenvektor pVec2A (Gaire et al., 1999), an den Schnittstellen der Restriktionsenzyme BamHI und NcoI die Sequenz des 2A-GFP-Fusionsproteins ausgeschnitten wurde und an den gleichen Schnittstellen des pTM1-Vektors einligiert wurde. Das transferierte 1,5 kb lange Fragment enthielt die Sequenz des 2A-Proteins des GFLV, sowie den ORF des GFP-Proteins. Die Funktionalität dieses Konstrukts wurde in Pflanzenzellen gezeigt (Gaire et al., 1999).

2.3. Bestimmung der Kinetik der viralen Proteinsynthese

Um die Kinetik der Proteinsynthese Poliovirus-infizierter BT7-H Zellen zu bestimmen, wurde die Radioaktivität von Proteinen in Zellysaten durch Flüssigszintillation gemessen, nachdem infizierte BT7-H Zellen mit radioaktiv markiertem Leucin inkubiert worden waren. Dazu wurden die Zellen zunächst als eintägige Kulturen bis zu 80% Konfluenz angesetzt und nach dem beschriebenen Protokoll mit Poliovirus Sabin1 infiziert. Zum Zeitpunkt der Messung der Proteinsyntheserate wurde das Medium in den Zellkulturschalen vollständig abgesaugt und durch 100 µl Medium mit 10 µCi / ml 3H-Leucin (Amersham, Dübendorf, Schweiz) ersetzt. Das 3H-Leucin hatte eine spezifische Aktivität von 1 mCi / ml, daher wurden

pro 100 µl Medium 10 µl der 3H-Leucin-Lösung eingesetzt. Die Zellkultur wurde anschließend für genau 10 min bei 37°C inkubiert. Diese 10 minütige Inkubation stellte die Zeit dar, die für den Einbau des radioaktiv markierten Leucins zur Verfügung stand, daher war es essentiell für die Aussagekraft des Experimentes, daß diese Zeit bei jeder Probenahme äußerst genau eingehalten wurde. Nach den 10 min Inkubation wurde der Überstand der Zellkulturschale in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und für 2 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Zellen des Kulturüberstandes durch Zentrifugation bei 1400 rpm und 4°C für 4 min sedimentiert und der Überstand verworfen. Währenddessen wurden die Zellen in der Kulturschale durch die Inkubation für 5 min auf Eis in je 1 ml NP40 (1%-Lösung in sterilem Wasser) vom Untergrund abgelöst. Nach mehrfachem Resuspendieren wurde die NP40-Lösung mit den abgelösten Zellen in die vorbereiteten Zentrifugenröhrchen mit dem Zellkulturüberstand gegeben und die Schale zweimal mit je 1 ml H₂O gespült und dieses in die Zentrifugenröhrchen überführt. Nach kräftigem Mischen der Lösungen im Zentrifugenröhrchen auf dem Vortex-Mixer wurden diese bei -20°C über Nacht eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Zentrifugenröhrchen mit den Proben aufgetaut und auf Eis gestellt. Die in den Zellen enthaltenen Proteine wurden nun durch 10% Trichloressigsäure und Inkubation für 45 min auf Eis präzipitiert. Zur Isolation der präzipitierten Proteine und zur Abtrennung des nicht in Proteine eingebauten radioaktiven 3H-Leucins wurde die Lösung durch einen kleinporigen Glasfaserfilter (GF/A, Whatman, Maidstone, Großbritannien) gesaugt und anschließend die Röhrchen sowie die Absaugvorrichtung dreimal mit 10% Trichloressigsäure-Lösung gespült. Die Glasfaserfilter wurden in ein Gefäß zur Flüssigszintillation gegeben und mit jeweils 800 µl 0,5 M NaOH für 45 min bei 50°C inkubiert. Anschließend wurden je 8 ml der Szintilations-Mischung Hionic-Fluor (Packard, Meriden, CT, USA) in die Gefäße gegeben und diese für mindestens 20 Sekunden auf dem Vortex-Mixer gemischt. Die folgende Szintilationsmessung wurde jeweils dreimal und für jeweils 5 min Messzeit pro Gefäß durchgeführt um deren Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Die erhaltenen Werte wurden gemittelt und in einer Graphik gegen die Infektionsdauer aufgetragen.

2.4. Immunfluoreszenz

Fixierung der Zellen

Zur Detektion intrazellulärer Proteine mit Hilfe von spezifischen Antikörpern mussten die untersuchten Zellen fixiert und permeabilisiert werden, damit die Antikörpermoleküle in das Innere der Zelle gelangen konnten. Dabei war es von entscheidender Bedeutung, daß durch die Fixierungsmethode die Strukturen der Zellen sowie die Antigene weitgehend erhalten blieben, die Zelle jedoch soweit permeabilisiert wurde, daß die großen Antikörpermoleküle in diese hineindiffundieren konnten. Die Fixierung mit Paraformaldehyd und die Permeabilisierung mit Triton X-100 war eine geeignete Methode, um diesen Kompromiß bei Immunfluoreszenzanalysen zu erreichen (Bolten et al., 1998).

Dazu wurden die auf Objektträgern kultivierten Zellen zunächst für 10 min in einer 4%igen Paraformaldehydlösung (Sigma, Buchs, Schweiz) in PBS bei 4°C inkubiert. Danach wurde das Paraformaldehyd durch eine 4%ige Paraformaldehydlösung ersetzt, die zusätzlich 0,2% Triton X-100 (Boehringer Mannheim AG, Mannheim) enthielt, um die Membranen der Zellen zu permeabilisieren. Anschließend wurden die Zellen mit PBS auf dem Horizontalschüttler bei 120 rpm für 5 min gewaschen. Die Aldehyde des Paraformaldehyd wurden in 0,5% Ammoniumchlorid (NH₄Cl) in PBS für 8 min gequenchet, da diese sonst unspezifisch die Antikörper binden und eine falsche Lokalisation der Fluoreszenzmarker bewirken konnten. Die Objektträger wurden nun zweimal für 5 min mit PBS auf dem Horizontalschüttler gewaschen, um das Ammoniumchlorid vollständig zu entfernen. Die Präparate wurden in ein neues Gefäß mit PBS überführt und konnten so bei 4°C und Dunkelheit bis zu 4 Wochen aufbewahrt werden.

Die Präparate für die Detektion des Cytoskeletts wurden wie oben beschrieben fixiert, jedoch wurde anstelle des PBS ein anderer Zellpuffer („LL-Puffer“, siehe Kapitel 2.8.) eingesetzt, der durch die spezielle Zusammensetzung der enthaltenen Salze, eine bessere Konservierung der Bestandteile des Cytoskeletts ermöglichte (L. Landmann, persönliche Mitteilung).

Durchführung der Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenzreaktion wurden die fixierten Zellen auf Objektträgern in mit Wasserdampf gesättigten Kammern inkubiert. Zunächst wurden die Präparate in 3% Milchpulver (Sanolait, Migros, Schweiz) in PBS bei 37°C für 10 min inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen der Antikörper zu blockieren. Nach kurzem Spülen in PBS folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in der jeweiligen Verdünnung für 45 min bei 37°C. Um ungebundene Reste des primären Antikörpers von den Präparaten zu eliminieren, wurden diese anschließend zweimal in PBS für 5 min bei 120 rpm auf dem Horizontalschüttler gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Präparate zur Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Konjugat) erneut für 45 min bei 37°C in die feuchte Kammer gegeben. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurde in Dunkelheit durchgeführt, um ein vorzeitiges Ausbleichen der an den Antikörper konjugierten Fluorochrome zu verhindern. Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurden die Präparate erneut zweimal für 5 min in PBS im Dunkeln gewaschen und anschließend - wie unten beschrieben - eingebettet. Zur simultanen Detektion zweier Antigene im gleichen Präparat (Doppelimmunfluoreszenz) wurden jeweils zwei primäre Antikörper unterschiedlicher Spezies verwendet, die durch korrespondierende anti Spezies-Antikörper markiert werden konnten, die an unterschiedliche Fluorochrome konjugiert waren. Für die simultane Detektion von Giantin und PV-2BC, waren ausschließlich zwei entsprechende Antikörper der gleichen Spezies (Maus) vorhanden. Um eine Doppelimmunfluoreszenz zum Nachweis dieser Antigene zu ermöglichen, wurden die Präparate zunächst mit dem monoklonalen Antikörper gegen Giantin behandelt, gefolgt von der Inkubation mit dem Cy3-anti Maus-Konjugat. Anschließend wurde eine Inkubation mit einem 1% Mausserum für 30 min bei 37°C durchgeführt, um freie Paratope des anti Maus-Antikörpers zu blockieren. Nach zwei Waschschritten mit PBS wurden die viralen 2B-Proteine mit dem Antikörper gegen PV-2B behandelt, der von S. Freigang und R. Zinkernagel (Zürich, Schweiz) direkt an das Fluorochrom FITC gekoppelt worden war. Das FITC-Signal dieses Antikörpers wurde verstärkt durch die folgende Inkubation mit einem Ziegenantikörper gegen FITC, der direkt an das Fluorochrom Alexa488 gekoppelt war.

Eindecken der Präparate für die Fluoreszenzmikroskopie

Zur Untersuchung der Präparate im Fluoreszenzmikroskop wurden die Objektträger mit den fixierten Zellen nach der Immunreaktion in Glycerin eingedeckt. Dem Glycerin wurden 2,5% (w/v) 1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan (=DABCO, Sigma, Buchs, Schweiz) zugesetzt, um ein vorschnelles Ausbleichen der Fluorochrome („Fading“) zu verhindern (Valnes und Brandtzaeg, 1985). Auf den gewaschenen Objektträger wurde jeweils ein kleiner Tropfen des Eindeckmediums vorgelegt, dann der Zellkultur-Objektträger mit den Zellen nach oben aufgelegt, dieser mit ca. 25 µl Glycerin-DABCO überschichtet und mit einem Deckglas abgedeckt. Für den Einsatz der Fluorochrome Cy2 und Cy3 war die Wirkung des DABCO jedoch nicht optimal, da es ein Ausbleichen dieser Fluorochrome nicht ausreichend reduzieren konnte. Nach Tests verschiedener „Anti fading“-Reagenzien wurde schließlich N-propyl-Gallat (NPG = 3,4,5-Trihydroxybenzolsäure N-Propylester, Sigma, Buchs, Schweiz) ausgewählt, da es in allen Versuchen das Ausbleichen dieser beiden Fluorochrome sowohl im konventionellen Fluoreszenzmikroskop als auch im konfokalen Mikroskop am wirkungsvollsten verhinderte (Longin et al., 1993). Das Eindeckmedium zur Untersuchung von Cy2- und Cy3-Konjugaten im Fluoreszenzmikroskop wurde wie folgt hergestellt: Gepuffertes Glycerin (Merck, Darmstadt; 90% Glycerin, 10% PBS, pH 7,4) wurde mit 10 g/l NPG versetzt und bei Raumtemperatur in Dunkelheit für 8 Std. auf einem Rotationsmixer gelöst. Da das Lösen des NPG in Glycerin dessen pH-Wert deutlich senkt, wurde anschließend mit 1N NaOH bzw. 1N HCl der pH-Wert auf 6,8 eingestellt. Das fertige Glycerin / NPG wurde bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

Eindecken der Präparate für die konfokale Mikroskopie

Für die ersten Untersuchungen im konfokalen Mikroskop wurden zusätzlich zwischen Objektträger und Deckglas zwei Parafilm-Spacer seitlich des Präparates angebracht, um ein Schwingen des Deckglases durch die Vertikalbewegung des

Mikroskopischs bei der Aufnahme von optischen Schnittserien zu verhindern. Dies erwies sich jedoch bei den engen Abständen und der geringen Dicke der einzelnen optischen Schnitte des Konfokalmikroskops als nicht ausreichend. Entsprechend wurde für die weiteren Untersuchungen das Eindeckmittel Mowiol (Hoechst, Frankfurt) verwendet, das durch die Reaktion mit Sauerstoff aushärtet und dadurch keine Bewegung des Präparates mehr ermöglicht. Dieses Eindeckmittel wurde nach folgendem Rezept hergestellt: 5 g Mowiol wurden in 20 ml Tris-Puffer (0,05M, pH 7,5) bei 30°C für 16 h auf dem Magnetrührer gelöst. Danach wurden 10 ml 100% wasserfreies Glycerin zugegeben und dieses bei 30°C für 16 h gerührt, bis sich das Mowiol vollständig gelöst hatte. Das gelöste Mowiol wurde nun im warmen Zustand für 3 min bei 2000 rpm abzentrifugiert und der pH-Wert auf 7,5 eingestellt. Vom Überstand der Mowiollösung wurden schließlich Aliquots zu je 2 ml erstellt und diese bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt. Zum Eindecken der Präparate wurde nach dem Auftauen dem Mowiol das „anti-fading“-Mittel NPG (siehe oben) in einer Konzentration von 10g/l zugesetzt und über Nacht auf einem Rotationsmischer gelöst. Die Präparate wurden nach dem gleichen Schema - wie bei der Herstellung des Glycerins beschrieben - eingedeckt. Anschließend wurden die Präparate bei 4°C über Nacht im Dunkeln aufbewahrt um das vollständige Aushärten des Mowiols zu gewährleisten.

2.5. Antikörper und Marker zur Detektion zellulärer und viraler Strukturen

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Immundetektion zellulärer und viraler Markerproteine bereits vorhandene primäre Antikörper von zwei Spezies verwendet. Monoklonale Antikörper waren aus Milzzellen immunisierter Mäuse gewonnen worden, die mit Maus-Myelom-Zellen fusioniert worden waren. Diese sogenannten Hybridomzellen waren nach deren Vermehrung aus der Aszites-Flüssigkeit von Mäusen isoliert worden und wurden in der Zellkultur vermehrt und die produzierten Antikörper isoliert. Polyklonale Antikörper waren Seren von mehrfach immunisierten Kaninchen oder Mäusen. Der Einfachheit halber werden im Folgenden die monoklonalen Maus-Antikörper mit „mkA“ die polyklonalen Kaninchenserum mit „pKS“ und die polyklonalen Mausseren mit „pMS“ abgekürzt. In der Tabelle 2 sind neben den Charakteristika des Antigens und der Herkunft der Antikörper auch die Verdünnungen, in denen diese in der Immunfluoreszenz eingesetzt wurden, angegeben.

Antikörper	Antigen	Verdünnung (IF)	Herkunft
AK gegen zelluläre Proteine			
anti p63 (mkA)	Transmembran-Protein des ER, verbindet ER mit Mikrotubuli	1: 1000	Dr. H.-P. Hauri, Basel, Schweiz
anti p63 (pKS)	Transmembran-Protein des ER, verbindet ER mit Mikrotubuli	1:600	Dr. H.-P. Hauri
anti Calnexin (pKS)	Luminales ER-Protein, Chaperon	1:150	StressGen Biotechnologies, Victoria, Kanada
anti Giantin (mkA)	Transmembranprotein des cis- und mittleren Golgi Apparates	1:800	Dr. H.-P. Hauri
anti GPI30 (mkA)	Transmembranprotein des cis- und mittleren Golgi Apparates	1:800	Dr. H.-P. Hauri
anti Sec13 (pKS)	Bestandteil des Sec31-Komplex des COPII-Coat, Bildung anterograder Transportvesikel	1:50	Dr. B. L. Tang, Singapur
anti Sec31 (pKS)	Bestandteil des Sec31-Komplex des COPII-Coat, Bildung anterograder Transportvesikel	1:50	Dr. B. L. Tang

anti Sec31 (mkA)	Bestandteil des Sec31-Komplex des COPII-Coat, Bildung anterograder Transportvesikel	1:50	Dr. B. L. Tang
anti MERG (pKS)	Antikörper gegen solubilisierte ER-Membranen, detektiert nicht genau charakterisierte ER-Membranproteine	1:600	Dr. D. Meyer, CA, USA
anti bet1 (pKS)	SNARE-Protein, verantwortlich für die Fusion anterograder Transportvesikel mit den Membranen des Zielorganells	1:50	Dr. B. L. Tang
anti YIP1 (pKS)	Transmembran-Protein des ER, Lokalisiert in ER-exit-sites, funktioniert wahrscheinlich als Cargo-Rezeptor	1:50	Dr. B. L. Tang
anti T7-Polymerase (pmS)	Lösliches Protein, RNA-Polymerase des Phagen T7	1:400	D. Egger und K. Bienz, Basel, Schweiz
anti p58K	Cytoplasmatisches Protein des Golgi-Apparates, verbindet die Golgi-Membranen mit den Mikrotubuli	1:50	Sigma, Buchs, Schweiz
anti GalT (mkA)	Beta 1,4-Galaktosyltransferase, Enzym des Golgi-Apparates	1:100	Nilsson et al., 1993; über J. Mackenzie, Brisbane, AUS
anti Tubulin (pKS)	Grundbaustein der Mikrotubuli, Cytoskelett	1:50	Boehringer Mannheim AG, Mannheim
anti Aktin (pKS)	Grundbaustein der Aktinfilamente, Cytoskelett	1:200	Sigma
anti CD155 (mkA)	Transmembranprotein der Plasmamembran, Poliovirusrezeptor, Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie	1:100	NeoMarkers, Union City, CA, USA
anti Cytochromb5 (pKS)	An die ER-Membranen gebundene Isoform des cytb5, Katalysator des oxidativen Stoffwechsels	1:600	Dr. Nica Borgese, Milano, Italien und Oxford Biomedical Research, Oxford, MI, USA
anti ERGIC53 (mkA)	membrangebundenes Lektin des ERGIC	1:800	Dr. H.-P. Hauri
anti EAGE (β -COP) (pKS)	Sequenz von β -COP, Bestandteil des COPI-Coat, Bildung der retrograden Transportvesikel	1:30	Dr. B. L. Tang
anti Grp78 (pKS)	=BiP = Immunoglobulin Heavy Chain Binding Protein, luminales ER Protein mit Chaperonfunktion	1:200	StressGen Biotechnologies
AK gegen virale Proteine			
anti 2B (mkA)	Poliovirus-Protein 2B, AK detektiert ebenfalls dessen Precursor 2BC, Funktion: siehe Einleitung	1:4	D. Egger und K. Bienz

anti 2C (pKS)	Poliovirus-Protein 2C, AK detektiert ebenfalls dessen Precursor 2BC, Funktion: siehe Einleitung	1:100	D. Egger und K. Bienz
anti 2C (mkA)	Poliovirus-Protein 2C, AK detektiert ebenfalls dessen Precursor 2BC, Funktion: siehe Einleitung	1:2	D. Egger und K. Bienz
anti VP1 (mkA)	virales Strukturprotein VP1, beteiligt an der Kapsidbildung	1:5	D. Egger und K. Bienz
anti Vpg (pKS)	„viral protein genome-linked“, kovalent an RNA-Genom des Poliovirus gebunden, Funktion bei Verpackung des Genoms und Replikation	1:800	D. Egger und K. Bienz
anti 2B-FITC (mkA)	Poliovirus Protein 2B, AK direkt gekoppelt an FITC, detektiert ebenfalls dessen Precursor 2BC, Funktion: siehe Einleitung	1:200	D. Egger und K. Bienz; FITC-Kopplung von Dres. S. Freigang und R. Zinkernagel, Zürich, Schweiz

Tabelle 3: Primäre Antikörper für die Immunfluoreszenz

In der vorliegenden Arbeit wurden die im Folgenden beschriebenen sekundären Antikörper (= Konjugate) verwendet. Entsprechend der beiden als primäre Antikörper eingesetzten Spezies, Kaninchen und Maus, wurden verschiedene gegen die Spezies der primären Antikörper gerichtete sekundäre Antikörper verwendet, die an verschiedene Fluorochrome gekoppelt waren. Diese sind wie folgt abgekürzt: Antikörper hergestellt in Ziegen gegen Maus-Antikörper (Goat anti Mouse = GAM), Antikörper hergestellt in Ziegen gegen Kaninchen-Antikörper (Goat anti Rabbit = GAR).

Antikörper	Absorptionsmax. / Emissionsmax. in nm	Verdünnung (IF)	Herkunft
GAM-Cy3	550/565	1:600	Jackson ImmunoResearch, Philadelphia, PA, USA
GAR-Cy2	489/506	1:400	Jackson ImmunoResearch
GAM-TexasRed	587/602	1:100	Sigma
GAM-Alexa488	495/519	1:800	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
GAR-TexasRed	587/602	1:200	Jackson ImmunoResearch
GAR-FITC	494/518	1:120	Sigma
GAM-FITC	494/518	1:80	Boehringer Mannheim AG
anti FITC-Alexa488 (direkt gekoppelter primärer AK)	495/519	1:400	Molecular Probes

Tabelle 4: Sekundäre Antikörper / Konjugate für die Immunfluoreszenz

Für die Untersuchungen des ER und des Cytoskeletts wurden außerdem Marker verwendet, durch die eine Detektion dieser Strukturen nicht aufgrund einer immunologischen Reaktion, sondern durch andere Wechselwirkungen, wie z. B. die hydrophoben Wechselwirkungen mit Lipiden (bei DiOC6) erreicht wurde. Diese weiteren Reagenzien für die Fluoreszenz-Detektion sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Antikörper	Absorptionsmax. / Emissionsmax. in nm	Verdünnung / Konzentration (IF)	Herkunft
ER-Tracker	374/430-640	300 nM im Zellkultur-Medium	Molecular Probes
DiOC6 (3,3-Dihexyloxo-carbocyanin-Iodid)	484/519	2,5 µg/ml in PBS	Sigma
Phalloidin-TRITC	587/602	1:100	Molecular Probes

Tabelle 5: Weitere Marker zur Fluoreszenzdetektion von Zellorganellen

2.6. Untersuchung von Kolokalisation im konfokalen Mikroskop

Konfokale Mikroskopie und Dekonvolution

Die in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts entwickelte „Confocal Laser Scanning Microscopy“ (CLSM, oder konfokale Mikroskopie) ermöglicht im Gegensatz zur herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie eine dreidimensionale Untersuchung von Präparaten. Das Hauptproblem der herkömmlichen Lichtmikroskopie ist die Tatsache, daß alle Ebenen in der Tiefe (also der Z-Achse) eines Präparates auf das gleiche mikroskopische Bild in nur zwei Dimensionen projiziert werden. Dabei wird die Auflösung in der Z-Achse des Präparates nur durch die Fokusebene des Mikroskops bestimmt und ist daher stark limitiert. Strukturen unterhalb und oberhalb der beobachteten Ebene können dabei nicht von denen in der Fokusebene getrennt dargestellt werden. Besonders bei der Untersuchung von Kolokalisationen verschiedener Marker ist dies eine entscheidende Limitierung der Methode, da keine Aussage darüber gemacht werden kann, ob diese Signale an den gleichen Strukturen vorkommen, oder übereinander liegen und daher nicht kolokalisieren. Die konfokale Mikroskopie ermöglicht es, die Bereiche unterhalb und oberhalb der beobachteten Ebene auszublenden und somit optische Schnitte von bis zu 100 nm Dicke durch das Präparat zu legen. Dadurch kann die Detektion falsch-positiver Kolokalisation durch die fehlende Auflösung in der Z-Achse des Mikroskops weitgehend ausgeschlossen werden. Die Aufnahme von optischen Schnitten wird durch die Verwendung einer Lochblende mit variablem Durchmesser ermöglicht, die aufgrund des Einfallswinkels der vom Präparat reflektierten Strahlung nur das Licht der Fokusebene passieren läßt. Der Präparatetisch ist mit einem feingängigen Piezomotor ausgestattet, der es erlaubt das Präparat in kleinen Schritten in der Z-Achse zu bewegen. Dadurch wird die jeweils nächste Ebene in den Fokus des optischen Systems gerückt. Als Lichtquelle dient im CLSM ein Laser, durch den - zusammen mit speziellen Filtern - Licht definierter Wellenlängen auf das Präparat geworfen wird. Das von den Fluorochromen emittierte Licht wird vor dieser Lochblende über einen dichroischen Teilerspiegel geleitet, der nur die Wellenlängen des emittierten Lichts passieren läßt. Die Fluoreszenz-Signale der Probe werden durch Photomultiplier elektronisch detektiert und als Rohbild digital abgespeichert.

Die konfokale Mikroskopie hat den Vorteil, daß die markierten Strukturen ohne den sogenannten „Out of focus blur“, also ohne unscharfe Abbildungen aus anderen Ebenen als der Fokusebene des Präparats abgebildet werden. Der Nachteil dieser Methode ist, daß Strukturen, die größer sind als die Dicke eines optischen Schnittes nur zum Teil mit dieser Methode abgebildet werden können. Dieser Nachteil wird allerdings durch eine zweite wichtige Anwendung der konfokalen Mikroskopie ausgeglichen. Mit einem konfokalen Mikroskop ist es möglich, eine Serie aufeinanderfolgender

optischer Schnitte durch ein Präparat hindurch aufzunehmen und diese entweder einzeln zu betrachten, oder eine dreidimensionale Rekonstruktion des Präparates anzufertigen (van der Voort und Strasters, 1995). Durch diese 3D-Rekonstruktion kann der Verlauf einer Struktur durch mehrere, der als „Z-Schnitte“ bezeichneten, optischen Schnitte verfolgt werden. Die einzelnen Z-Schnitte der horizontalen Ebene haben einen deutlich reduzierten Hintergrund durch die Eliminierung des Streulichtes und ermöglichen daher zusätzlich zur optimierten Auflösung in der Z-Achse auch eine bessere Auflösung in der X- und Y-Achse (van der Voort und Strasters, 1995; Demandolx und Davoust, 1997).

Bei der Detektion von Fluoreszenzsignalen kommt es trotz der verbesserten Auflösung auch in der konfokalen Mikroskopie noch zu Hintergrund- und Streufluoreszenz einerseits und Verzerrungen durch das optische System des Mikroskops andererseits. Verbleibender Hintergrund entsteht durch unspezifische Markierung der Fluorochrome im Präparat und die Tatsache, daß das Signal aus den außerhalb des Fokus liegenden Ebenen nicht vollständig eliminiert werden kann. Außerdem Hintergrundsignal durch spontane Entladungen der Photomultiplier, die daher nicht vorhandene Signale detektieren (van der Voort und Strasters, 1995, Demandolx und Davoust, 1995). Die Verzerrungen des optischen Systems sind hauptsächlich durch chromatische und sphärische Aberrationen der Linsen bedingt und sind charakteristisch für das jeweils verwendete Mikroskop bzw. das verwendete Objektiv.

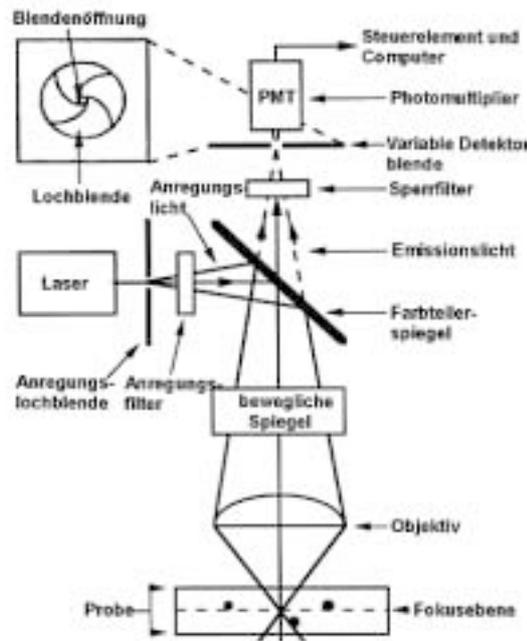


Abb. 12: Aufbau und Strahlengang eines konfokalen Mikroskops (CLSM). Das CLSM ist ein Epifluoreszenzmikroskop mit einer Laser-Lichtquelle, dessen Lichtstrahlen durch Anregungsfilter auf bestimmte Wellenlängen definiert werden. Der Farberteilerspiegel trennt das Licht verschiedener Wellenlängen, da er für bestimmte Wellenlängen durchlässig ist und andere reflektiert. Die Detektorblende (oder „pinhole“) ermöglicht das Ausblenden der Lichtstrahlen von außerhalb der Fokusebene. Die Probe wird durch ein Piezo-Element relativ zur Fokusebene bewegt. (Bild entnommen aus: Centonze und Pawley, 1995)

Um die Auflösung des konfokalen Mikroskops zu verbessern, bzw. die Genauigkeit nahe der Auflösungsgrenze des Mikroskops zu optimieren, wurde in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts eine mathematische Methode entwickelt, mit der sowohl die Aberrationen des optischen Systems als auch der verbleibende Hintergrund reduziert werden können (van der Voort und Strasters, 1995). Diese Methode wurde als Dekonvolution (von engl. „deconvolution“) bezeichnet

und ermöglicht mit Hilfe mathematischer Algorithmen die Bestimmung einer Abbildungsfunktion, die die Aberrationen des optischen Detektions-Systems des Mikroskops beschreibt und die Hintergrundfluoreszenz eines Präparates reduziert. Diese Informationen werden anschließend in den originalen Bildstapel eingerechnet und die durch das Mikroskop eingebrachten Fehler dadurch reduziert.

Für die Anwendung der Dekonvolution in dieser Arbeit wurde zunächst eine mathematische Funktion berechnet, die anhand eines idealen geometrischen Körpers die Abbildungsfehler des optischen Systems darstellt. Dazu wurde von fluoreszierenden Latex-Kugeln eine Serie von aufeinanderfolgenden Z-Schnitten aufgenommen. Die Latex-Kugeln repräsentieren massive perfekte Sphären, die auch in ihrem Innern fluoreszieren. Daher kann die exakte Geometrie der Latex-Kugeln mathematisch berechnet werden. Die dreidimensionale Rekonstruktion des mikroskopischen Bildes der Latex-Kugeln stellt nun die Abweichungen der mikroskopischen Aufnahme der definierten Gestalt der Kugeln dar. Diese Abweichungen können in einer Gleichung ausgedrückt werden, die für jedes Mikroskop, jedes Objektiv und jede Wellenlänge charakteristisch ist. Diese mathematische Funktion wird als „Point Spread Function“ (= PSF) bezeichnet, da sie für jeden Bildpunkt einer Aufnahme die Position und Eigenschaften im Präparat angibt.

Der Hintergrund eines Bildes wird während der Dekonvolution durch eine Fourier-Transformation der Bildinformation reduziert. Dabei wird das Phänomen ausgenutzt, daß ein detektiertes Lichtsignal in charakteristische Frequenzen umgewandelt werden kann. Je geringer die Amplituden und je höher die Frequenz dieser Signale, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, daß es sich dabei um Hintergrund handelt. So kann auch in der Nähe fluoreszierender Strukturen der Hintergrund vom Signal unterschieden werden (van der Voort et al., 1995). Während der Dekonvolution wird im verwendeten Programm jeder Bildpunkt gemäß seiner Position und Intensität mit den umliegenden Bildpunkten sowie mit der Point-Spread-Function verglichen, und dadurch dessen relative Position und Intensität im Präparat bestimmt. Als Ergebnis der Anwendung der Dekonvolution erhält man also ein Modell des Präparates, das der Realität bedeutend näher kommt als das im CLSM erstellte mikroskopische Bild.

Berechnung der „Point Spread Function“ (PSF)

Die Point Spread Function wurde zusammen mit L. Landmann (Anatomisches Institut der Universität Basel, Schweiz) berechnet, indem zunächst eine Serie aufeinanderfolgender Z-Schnitte durch ein Präparat mit Latex-Kugeln von 220 nm Durchmesser aufgenommen wurde. Für die spätere Berechnung der PSF war essentiell, daß die Parameter bei der Bildaufnahme der Latex-Kugeln exakt mit denen übereinstimmten, die für die Bildaufnahme bei den zu untersuchenden Präparaten gewählt wurden. Nur so war sicher gestellt, daß die für das Mikroskop spezifischen Aberrationen auch in beiden Fällen gleich waren, also von der berechneten PSF auf das untersuchte Präparat extrapoliert werden konnte. Weiterhin mußten die Latex-Kugeln in ein aushärtendes Medium eingebettet werden (Mowiol), da eine Eigenbewegung der Kugeln während der Aufnahme der Bilder zu Artefakten bei der Berechnung der PSF führt (Imaris / Huygens Manual, Bitpane 2000). Die Lösung der Latex-Kugeln mußte so weit verdünnt werden, daß die Kugeln ausreichend weit auseinander liegen, damit sich die Streufluoreszenz der Kugeln nicht überschneidet, da sonst die einzelnen Voxel des Bildes nicht auf einen Ursprung zurückgerechnet werden konnten (Imaris / Huygens Manual, Bitpane 2000).

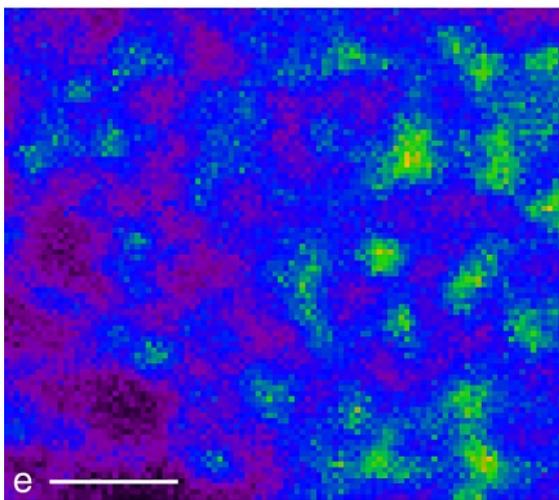
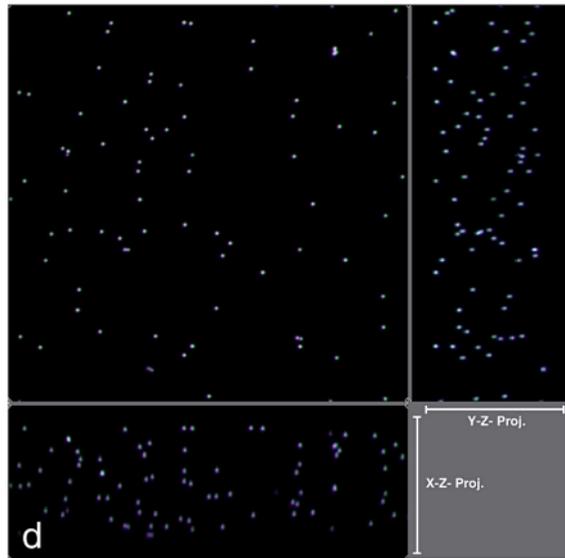
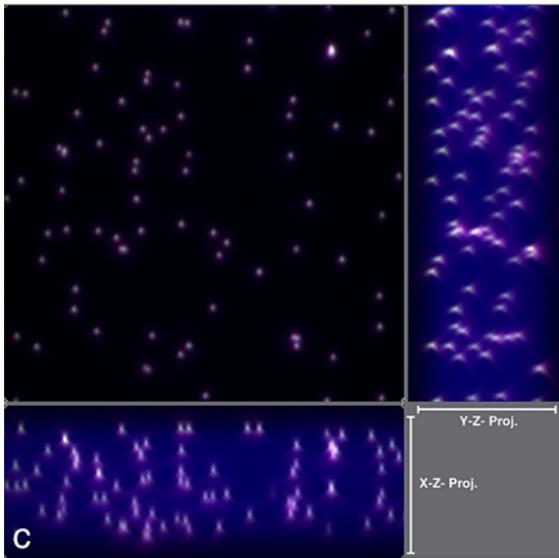
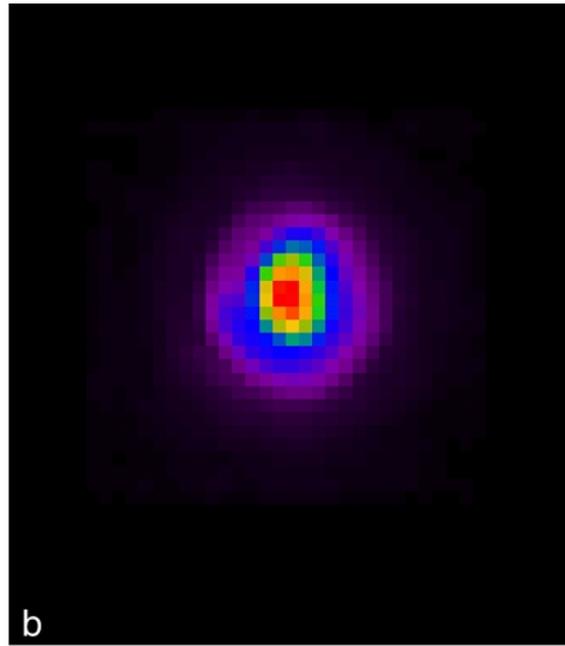
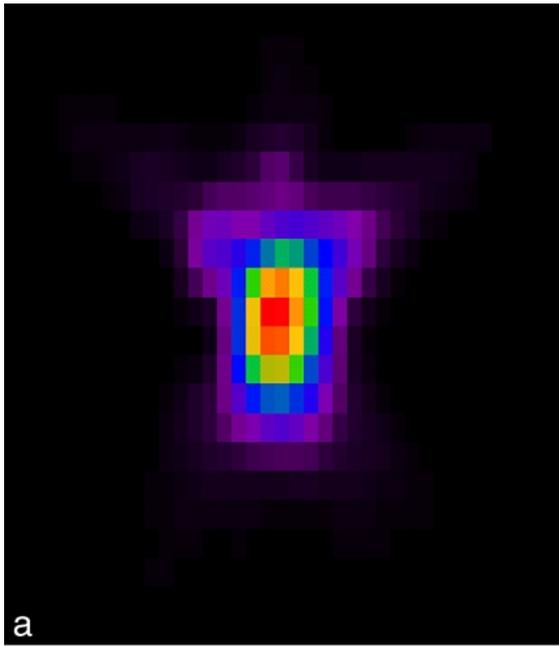
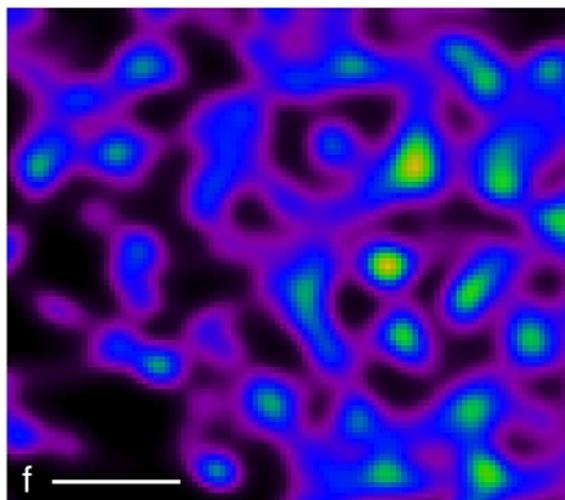


Abb. 13



Die Latex-Kugeln wurden mit Fluorochromen behandelt, die durch das Quellen der Latex-Kugeln mittels hypotonem Medium bis ins Innere der Latex-Kugeln gebracht wurden. Anschließend wurden die Latex-Kugeln durch Inkubation mit hypertonem Medium wieder auf ihre ursprüngliche Größe gebracht. Aufgrund der geringen Größe und der Durchfärbung der Latex-Kugeln können diese bei der Auflösung des CLSM als ideale Sphären, also als mathematisch exakt definierbare geometrische Figuren betrachtet werden. Nach Aufnahme der Bildstapel dieses Präparates wurden im Huygens-Modul der Imaris-Software (Bitplane AG, Zürich, Schweiz) zunächst die Bilder der einzelnen Latex-Kugeln gemittelt, wodurch das Verhältnis von Signal zu Hintergrund verbessert wurde und eine eventuell zufällig abweichende Form einzelner Kugeln die Berechnung der PSF nicht zu stark verfälschen konnte. Zum Mitteln der Aufnahmen der Latex-Kugeln wurden mindestens 10 Exemplare, idealerweise über 15 Exemplare herangezogen. Abbildung 13 zeigt eine Darstellung der gemittelten Latex-Kugeln in der Projektion in der horizontalen und der vertikalen Ebene. Die typischen durch das Mikroskop erzeugten Abbildungsfehler sind die Verzerrung der Form der Kugeln besonders in der vertikalen Ebene (Z-Achse) des Bildes sowie das Streulicht, das trotz der konfokalen Lochblende in den außerhalb des Fokus liegenden Ebenen detektiert wird. Dieses "Sanduhr-ähnliche" Aussehen der runden Latex-Kugeln wird als „missing cone“-Phänomen bezeichnet und ist in Abbildung 13 am oberen Ende des Fluoreszenzsignals der gemittelten Latex-Kugeln zu sehen. Das „missing cone“-Phänomen beschreibt die Tatsache, daß die Fluoreszenz eines Objekts im Konfokalmikroskop oberhalb und unterhalb des Objekts einen Ring bildet, also außerhalb der Struktur ein Kegel des Streulichts nicht abgebildet wird. Dies hängt mit der Abbildungsfunktion der Linsen des Mikroskops zusammen und reduziert die Auflösung des Mikroskops. Für die Abbildung der gemittelten Form der Latex-Kugeln wurde nun eine mathematische Funktion (= PSF) ermittelt, die jedem detektierten Bildpunkt einen Bildpunkt im Modell der idealen Sphäre der Latex-Kugel zuordnet. Die in der Abbildung 13 gezeigte Figur ist also die graphische Darstellung der PSF einer perfekten Sphäre unter den verwendeten Bedingungen der Bildaufnahme. Die Anwendung der PSF auf die später unter den gleichen Bedingungen aufgenommenen Bilder ermöglicht den umgekehrten Prozeß, also das Extrapolieren von einem aufgenommenen Bild zu seiner ursprünglichen realen Form, die Dekonvolution.

Durchführung der Dekonvolution

In der vorliegenden Arbeit wurde die Dekonvolution unter Verwendung des Huygens-Moduls der Imaris-Software (Bitplane, Zürich, Schweiz) durchgeführt. Diese Software war auf einer Silicon Graphics Workstation O2 (Silicon Graphics Instruments, Mountain View, CA, USA) unter einer Unix-Oberfläche installiert.

Für die Dekonvolution mikroskopischer Bilder finden sich eine Vielzahl verschiedener Algorithmen in der Literatur, wobei zwei dieser Algorithmen bei der Bildrestaurierung konfokalmikroskopischer Bilder überwiegend eingesetzt werden, da sie dort die besten Ergebnisse liefern (Shaw, 1994; van der Voort, et al., 1995; Scalettar et al., 1996). Die

Abb. 13: Point Spread Function (PSF) und Reduktion der Abbildungsfehler des CLSM durch Dekonvolution. Darstellung der durch die CLSM-Aufnahme und das Mitteln von fluoreszierenden Latex-Kugeln von 220 nm Durchmesser sowie Berechnung der Abbildungsfunktion erhaltene Point Spread Function des verwendeten Mikroskops (a und b). In der X-Y-Projektion der PSF sind nur geringe Abweichungen von der sphärischen Form der Latex-Kugeln zu erkennen (a), während die X-Z-Projektion die deutlichen Abbildungsfehler des Mikroskops in der Z-Achse des Präparates demonstriert (b). Die Aufnahme der Bildserie von Latex-Kugeln mit dem CLSM demonstriert die Abbildungsfehler des Mikroskops durch die unscharfe Repräsentation der Latex-Kugeln besonders in der Z-Achse des Präparates (c, X-Z- und Y-Z-Projektionen). Nach der Dekonvolution mit der errechneten PSF ist die Streufluoreszenz deutlich reduziert bzw. das Verhältnis von Signal zu Hintergrund deutlich verbessert. Dies resultiert in einer gesteigerten Auflösung in den dekonvolvierten Bildstapeln, besonders in der Z-Achse des Präparates (d, X-Z- und Y-Z-Projektionen). Bei höherer Vergrößerung wird in Falschfarbbildern der MIPs das optimierte Signal- zu-Hintergrund-Verhältnis nach der Dekonvolution (f) im Gegensatz zum gleichen Bild vor der Dekonvolution (e) dargestellt (Markierung uninfiltrierter BT7-H Zellen mit dem ER-Marker p63, Maßstäbe 0,5 µm).

Dekonvolution der CLSM-Bildserien in der vorliegenden Arbeit wurde im sogenannten „Maximum Likelihood Estimation“ Modus (MLE) durchgeführt. Diese Methode eignet sich speziell für Bilder mit hohem Rauschen, wie sie normalerweise mit dem CLSM aufgenommen werden. Diese Bilder sind gekennzeichnet durch ein mittleres Verhältnis von Signal zu Hintergrund (zwischen 2 und 20), einen zusätzlichen inhomogenen Hintergrund durch spontane Entladungen der Photomultiplier und durch eine hohe Auflösung (also geringe Dicke der Z-Schnitte). Aus der Anwendung der MLE resultiert unter diesen Bedingungen ein besonders genaues, also realitätsnahes Modell der konfokalen Bildserien. In den in dieser Arbeit erstellten Bildserien lag das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis in den meisten Fällen über 3, jedoch nie unter 2, was bedeutet, daß die Stärke des Signals mindestens doppelt so hoch war wie die errechnete Intensität des Hintergrunds. Daher war die Anwendung der MLE-Methode zur Dekonvolution der Bildserien dieser Arbeit gut geeignet.

Bei Aufnahmen im konventionellen Fluoreszenzmikroskop und speziell beim Einsatz von gekühlten CCD-Kameras werden die Bilder als rauscharm eingestuft, diese besitzen normalerweise ein Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis von über 20. Für solche rauscharmen Bilder wird die iterative Methode nach Tikonov-Miller (ICTM für „iterative constrained Tikhonov-Miller method“) zur Dekonvolution eingesetzt, die weniger zeitaufwendig ist. Die ICTM führt jedoch bei stärker verrauschten Bildern und besonders bei CLSM-Bildern nicht zu befriedigenden Ergebnissen bei der Bildrestaurierung durch die Dekonvolution.

Aufnahme der Bildstapel im CLSM

Um eine erfolgreiche Dekonvolution durchführen zu können, mußten verschiedene Bedingungen erfüllt werden, die im Folgenden dargestellt sind. Die Grundvoraussetzung für die Dekonvolution ist, daß die PSF unter den gleichen Parametern aufgenommen wird, wie der später zu dekonvoluierende Bildstapel. Dazu mußte zunächst das gleiche optische System (besonders Linsen des Okkulars mit Numerischer Apertur) sowie die gleichen Objektträger und Deckgläser verwendet werden. In dieser Arbeit wurde ausschließlich das apochromatische 100er Okkular des CLSM verwendet (Leica 100x/nA 1,4). Weiterhin mußten das gleiche Eindeckmedium (Mowiol) und das gleiche Immersionsöl (Zeiss Imersol 518F; Zeiss, Jena) wie bei der Bestimmung der PSF eingesetzt werden, da der Brechungsindex dieser beiden Substanzen eine zentrale Rolle bei den Aberrationen des optischen Systems spielt. Der Brechungsindex des Mowiol war 1,440; der des Immersionsöls war 1,518. Die detektierten Fluorochrome sowie die Anregungs- und Emissionswellenlängen wurden ebenfalls nicht verändert. Der Radius des Pinholes (also der Radius der zurück projizierten Apertur der Detektoröffnung) war in allen Fällen 250 µm. Alle Bildstapel wurden im 8-bit Format mit der Auflösung 512 x 512 Pixel aufgenommen. Gemäß des Nyquist-Theorems (Webb und Dorey, 1995; Imaris / Huygens Manual, Bitplane, 2000), das die Anforderungen der Dicke der einzelnen optischen Schnitte zur Dekonvolution beschreibt, wurde diese in den Aufnahmen zwischen 70 und 100 nm gewählt. Dadurch wurde eine leichte Überschneidung der Z-Schnitte erreicht („oversampling“) und es wurde sichergestellt, daß kein Signal in der Z-Achse verloren ging (Webb und Dorey, 1995; van der Voort und Strasters, 1995; Shaw, 1994).

Bestimmung des Hintergrundfluoreszenz und des Durchblutens

Nach der Aufnahme der Bildserie wurden zunächst die einzelnen Bilder auf die Intensität der Hintergrundsignale untersucht. Im Huygens-Modul gibt es für die Bestimmung des mittleren Hintergrundes eine Funktion, die über eine statistische Analyse des Bildstapels dessen durchschnittlichen Hintergrund berechnet. Dieser errechnete Wert wurde anschließend manuell überprüft. Dafür wurde im Huygens-Modul bei hoher Vergrößerung der Bilder die Intensität einzelner oder maximal zwei nebeneinander liegender Pixel bestimmt, die nicht mit einer markierten Struktur assoziiert waren. Bei Abweichungen der durch den Computer ermittelten von den manuell bestimmten Werte, wurde eine erneute manuelle Bestimmung des Hintergrunds durchgeführt, um die zuvor ermittelten Werte zu validieren. Bei einer Übereinstimmung

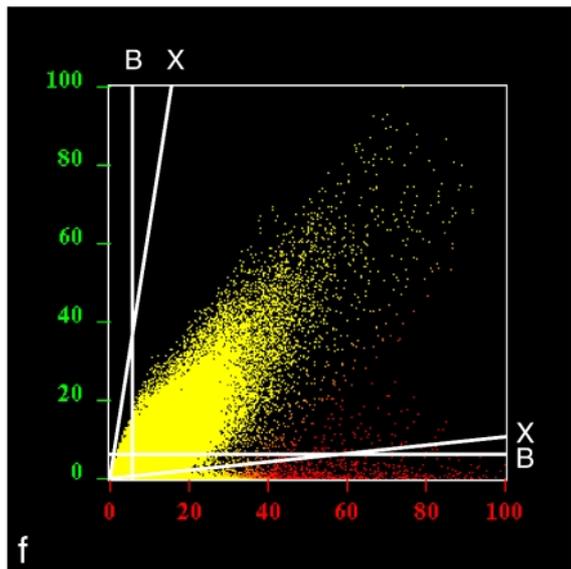
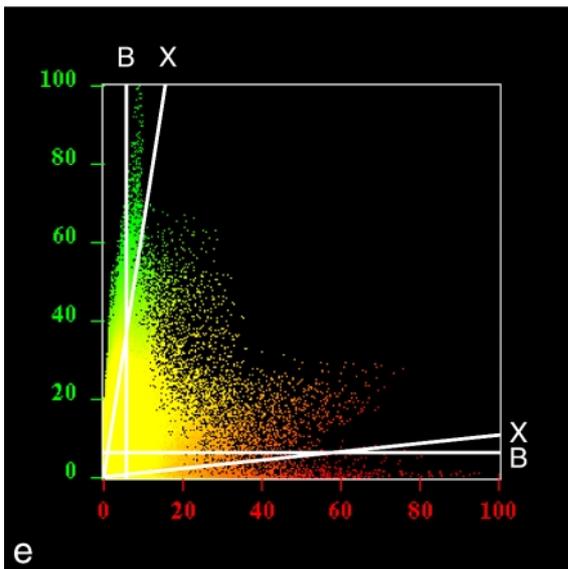
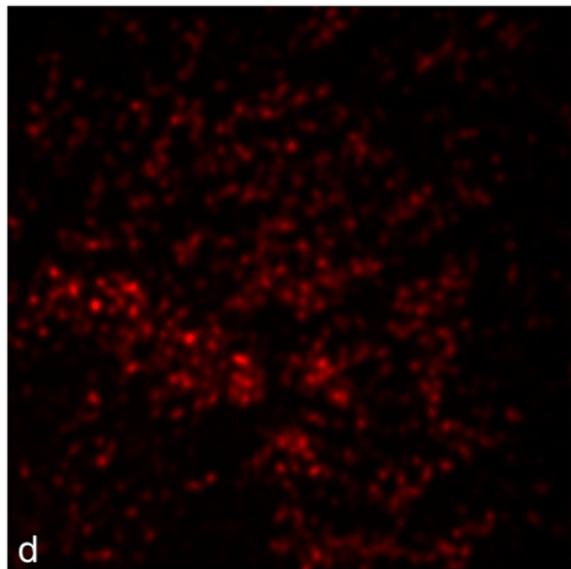
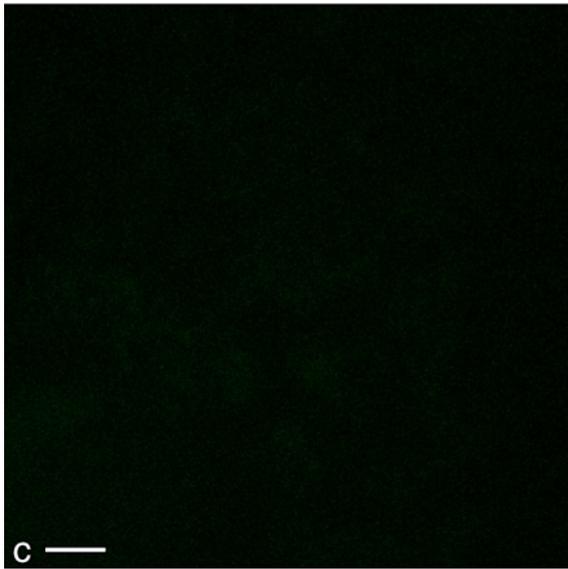
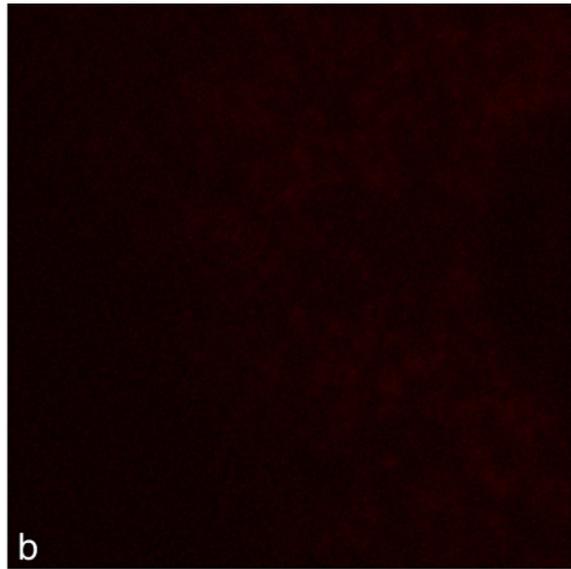
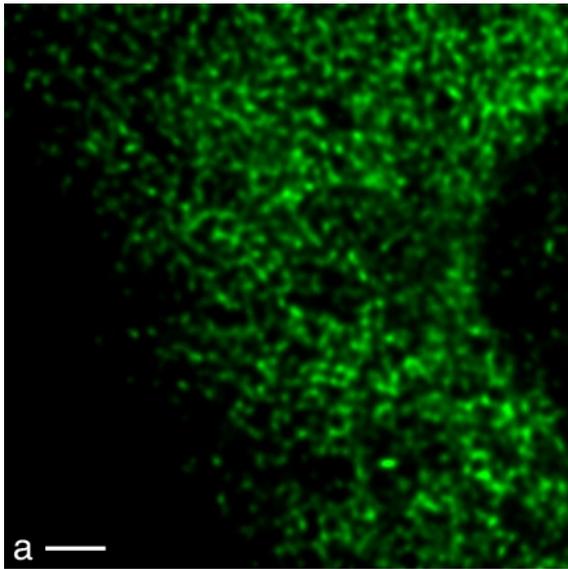


Abb. 14

beider Werte der manuellen Bestimmung diese für die Dekonvolution gewählt. Bei allen Aufnahmen der vorliegenden Arbeit erreichte der Hintergrund einen maximalen Wert von 6%, entsprechend ca. 15 von 256 Graustufen bei 8 bit-Auflösung.

Der für die Dekonvolution benötigte Wert des Verhältnisses von Signal zu Hintergrund der Rohdaten des konfokalen Mikroskops errechnet sich aus der maximalen, im gesamten Bilderstapel detektierten Fluoreszenzintensität (maximal 255) und dem zuvor bestimmten Hintergrund der Aufnahmen. Die maximale Intensität wurde dazu durch den Wert des Hintergrunds dividiert und aus dem Ergebnis die Quadratwurzel gezogen. Der erhaltene Wert wurde auf maximal eine Stelle hinter dem Komma gerundet und als näherungsweise Verhältnis von Signal zu Hintergrund in der Berechnung der Dekonvolution verwendet.

Vor Beginn der Dekonvolution wurden nun noch die Werte für die maximale Anzahl der einzelnen Optimierungsschritte auf 40 festgesetzt sowie die minimale Qualitätssteigerung pro Optimierungsschritt auf 0,1% festgesetzt. Dies diente dazu, die Dekonvolution ab der Qualitätsstufe zu beenden, von der an mit keiner signifikanten Steigerung des Verhältnisses von Signal zu Hintergrund mehr zu rechnen war. Die Optimierung der Restaurierungsqualität folgt einer asymptotischen Kurve, die sich einem Maximum zwar immer mehr nähert, dies jedoch nie erreicht, da sie als Funktion eines fehlerhaften Ausgangsbildes nur eine Näherung an ein fehlerfreies Bild darstellen kann. Aus diesem Grund wurde die iterative Dekonvolution beendet, wenn das Verhältnis von Signal zu Hintergrund pro Optimierungsschritt um weniger als 0,1% des vorherigen Wertes verbessert wurde (Imaris / Huygens Manual, 2000).

Bei simultaner Detektion zweier Kanäle während der Aufnahme eines Bilderstapels mußte sichergestellt werden, daß kein Durchbluten eines Fluorochroms in den zweiten Kanal stattfand. Der Begriff des „Durchblutens“ bezeichnet das Phänomen, daß an einer Stelle mit starkem Signal des ersten Fluorochroms im zweiten Kanal ein Signal detektiert wird, obwohl sich dort kein Signal des zweiten Fluorochroms befindet. Durchbluten entsteht meist durch die ungenügende Übereinstimmung der spektralen Charakteristika der verwendeten Fluorochrome und Filter oder der zu hohen Lichtintensität des Lasers und resultiert in falsch-positiver Kollokalisation. Das Durchbluten von Fluorochromen wurde unter den gegebenen Aufnahmeparametern für beide detektierten Fluorochrome im jeweils anderen Detektionskanal bestimmt. Dies wurde anhand von Präparaten durchgeführt, bei denen jeweils nur eines der verwendeten Fluorochrome eingesetzt und eine Bildserie beider Kanäle aufgenommen wurde. Die maximale Fluoreszenzintensität, die im Detektionskanal des nicht-markierten Fluorochroms detektiert wurde, stellte die maximale Intensität des Durchblutens dar. Um zu überprüfen, daß es sich bei dem als Durchbluten klassifizierten Signal nicht um unspezifische Hintergrundfluoreszenz handelte, wurden einzelne Strukturen, in denen die Fluoreszenzintensität des Durchblutens am höchsten war, im markierten Kanal untersucht. Falls dort ebenfalls hohe Fluoreszenzintensitäten vorhanden waren, ließ das auf Durchbluten schließen.

Abb. 14: Untersuchung des Durchblutens der verwendeten Fluorochrome und Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz dekonvolvierter Bildserien des CLSM. a bis d: Uninfizierte BT7-H Zellen wurden mit anti p63 Antikörper und Cy2-Konjugat behandelt, in den MIPs konnte nur schwaches Durchbluten vom Cy2-Kanal (a) in den Cy3-Kanal (b) detektiert werden. Poliovirus-infizierte BT7-H Zellen wurden mit anti 2B-Antikörper und Cy3-Konjugat behandelt, in den MIPs stark fluoreszierender Zellen wurde ebenfalls kein Durchbluten vom Cy3-Kanal (d) in den Cy2-Kanal (e) detektiert. e und f: Die Bestimmung der maximalen Werte des Durchblutens und der Hintergrundfluoreszenz wurde bei höherer Vergrößerung in den Einzelschnitten genauer durchgeführt. Diese Untersuchungen führten zur Detektion von maximalen Werten des Durchblutens vom Fluorochrom Cy2 in den Cy3-Kanal von 17% und vom Fluorochrom Cy3 in den Cy2-Kanal von 10%, auch bei verschiedenen Verteilungen der Intensitäten der Signale (X in Abb. 14e und f). Die maximale Intensität der Hintergrundfluoreszenz betrug unter allen Bedingungen 6% (B in Abb. 14e und f). Diese Werte wurden als untere Grenze der Intensitäten der Kollokalisation gewählt, wodurch falsch positive Kollokalisation durch die Detektion von Hintergrund oder Durchbluten ausgeschlossen wurde (e und f). Maßstäbe: 2 µm (a und c).

Falls in diesen Bereichen kein Signal im zweiten, markierten Kanal zu finden war, mußte es sich um unspezifisches Hintergrundsignal handeln. Bei den in dieser Arbeit gewählten Einstellungen des Konfokal Mikroskops überstieg das Durchbluten vom grünen (Cy2) in den roten Kanal nie den Wert von 10% (25 der maximalen 256 Graustufen bei 8 bit) und das Durchbluten vom roten (Cy3) in den grünen Kanal nie den Wert von 17% (44 der maximalen 256 Graustufen bei 8 bit) (siehe Ergebnis-Teil dieser Arbeit). Da der relative Anteil des Durchblutens eines Fluorochroms bei konstanten Aufnahmeparametern ebenfalls konstant ist, steigt der totale Wert des Durchblutens proportional zur Intensität des Fluorochroms an. Dies kann deutlich in Histogrammen (siehe nächstes Kapitel) als lineares Abweichen der Pixelverteilung vom Nullwert des jeweils anderen Kanals beobachtet werden.

Darstellungsmöglichkeiten dekonvolvierter Bildserien des CLSM

Durch die Dekonvolution erhält man einen Bildstapel von aufeinanderfolgenden Z-Schnitten, deren Auflösung in allen Dimensionen gegenüber den Original-Bildern optimiert ist. Dieser Bildstapel läßt sich mit Hilfe der Imaris-Software auf verschiedene Arten analysieren und darstellen. Im Ergebnis-Teil dieser Arbeit sind anhand des Beispiels einer mit Poliovirus-infizierten Zelle bei Detektion des ER-Markers p63 und des viralen Proteins 2B alle genannten Arten der Analyse dekonvolvierter Bilder dargestellt (Abb. 27 bis 30).

Galerien von Einzelschnitten

In einer Galerie können die einzelnen aufeinanderfolgenden Schnitte eines Bildstapels separat dargestellt werden. Das bedeutet, es kann jede einzelne Ebene der aufgenommenen Zelle wie ein herkömmlicher Einzelschnitt eines konfokalen Mikroskops, jedoch mit der erhöhten Auflösung nach der Dekonvolution, analysiert werden (Abb. 29a).

Maximal Intensity Projections (MIP)

Vom gesamten Bildstapel des Präparates kann eine zweidimensionale Projektion erstellt werden, die der Ansicht eines herkömmlichen Fluoreszenz-Mikroskops, jedoch mit verbesserter Auflösung durch die Dekonvolution, entspricht. In dieser Darstellungsweise wurden alle Bilder einer Serie übereinandergelegt und die Signale mit der höchsten Intensität als hellste Bildpunkte dargestellt (maximaler relativer Wert: 255). Daher wird diese Darstellung als „maximal intensity projection“ (MIP) bezeichnet. Nach der Dekonvolution ermöglicht also das MIP eine gleichzeitige, fokussierte Darstellung aller Ebenen des Präparates innerhalb eines einzigen zweidimensionalen Bildes. Daher kann mit einem MIP eine Analyse der Verteilung des Signals besonders in der X-Y-Ebene des kompletten aufgenommenen Präparats durchgeführt werden (Abb. 27e und 28a).

Histogramme

Histogramme dienen der statistischen Darstellung und Auswertung der Fluoreszenzintensitäten beider Kanäle des Bildstapels eines Präparates. Dazu wurde von allen aufeinanderfolgenden Z-Schnitten eine statistische Berechnung der Verteilung der Signalintensitäten durchgeführt und die Werte in eine Grafik eingezeichnet, die als Histogramm bezeichnet wird (Abb. 27f bzw. 14e und f). In Histogrammen wird jedes einzelne Voxel entsprechend seiner relativen Fluoreszenzintensität für beide detektierten Kanäle aufgetragen. Daher ist es möglich, anhand von Histogrammen die Verteilung der Kolo-kalisation zweier Signale in einem Präparat zu bestimmen. Es können z.B. Voxel, die eine hohe Fluoreszenzintensität in beiden Kanälen aufweisen, sehr leicht von solchen unterschieden werden, die in einem Kanal deutliche Fluoreszenz zeigen und im zweiten Kanal ausschließlich Hintergrund-Fluoreszenz aufweisen. Die Histogramme in Abbildung 14 wurden von Bildstapeln berechnet, in denen die beiden detektierten Signale kolo-kalisieren (Abb. 14e) oder in denen die Signale weitgehend getrennt vorkommen (Abb. 14f). Anhand der Verteilung der Pixelwolken entlang der 45 Grad-Achse des Histogramms in Abbildung 14f ist deutlich zu erkennen, daß die meisten Bereiche dieses Präparates ein gleich hohes konstantes Verhältnis beider Signale aufweisen. Das Vorgehen bei der Bestimmung der Kolo-kalisation ist im nächsten Kapitel beschrieben.

Histogramme können ebenfalls von einzelnen Z-Schnitten dargestellt werden, wodurch sie über die Verteilung der Signale in einzelnen Ebenen des Präparates Aufschluß geben können (Abb. 29b). Der Vergleich der optischen Einzelschnitte mit den korrespondierenden Histogrammen ermöglicht daher eine genaue Bestimmung der Verteilung der Fluoreszenzintensitäten und der Kolo-kalisation beider Marker in den einzelnen Ebenen des Präparates. Histogramme können weiterhin eingesetzt werden, um bestimmte Populationen von Signalintensitäten einer bestimmten Struktur zuzuordnen. Dazu wurde die Population von Interesse im Histogramm markiert und die markierten Voxel als gelbes Signal in die Einzelschnitte oder MIPs eingetragen. Dadurch konnten den ausgewählten Pixelpopulationen die entsprechenden Strukturen zugeordnet werden.

X- Y- Z-Projektionen

Durch X- Y- Z-Projektionen können die Z-Achsen der aufgenommenen Bildstapel ohne weitere Berechnung einer 3D-Rekonstruktion in einer Abbildung dargestellt werden, was die Beurteilung der horizontalen Orientierung der Signale innerhalb des Präparates ermöglicht. Mit Hilfe dieser Darstellungsmethode können z.B. Fehlerquellen frühzeitig ausgeschlossen werden, wie z.B. ein starkes Ausbleichen der Fluorochrome während der Aufnahme der Bildstapel. Außerdem kann der Verlauf der Signale in der Z-Achse für verschiedene Teilbereiche des Präparates schnell analysiert werden (Abb. 28b).

Isosurfaces

Isosurfaces sind eine Möglichkeit, ein dreidimensionales Modell der Oberflächen der mit den Fluorochromen assoziierten Strukturen zu erstellen. Dieses Verfahren wird auch als „Surface Rendering“ bezeichnet, da bei einer bestimmten, konstanten Fluoreszenz-Intensität eine Oberfläche der angenommenen Struktur gezeichnet wird. Durch diese Oberflächendarstellung wird eine Beurteilung der Position der markierten Strukturen zueinander ermöglicht und der Bereich der Kolo-kalisation zweier Marker an den Strukturen der Präparate dargestellt (Abb. 30).

Nach der dreidimensionalen Rekonstruktion der Bilderserie wurden die Fluoreszenzintensitäten der markierten Strukturen in den MIPs und den X- Y- Z- Projektionen beurteilt, um den Schwellenwert der im Isosurface abzubildenden Strukturen zu bestimmen. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Schwellenwert in jedem Bild als relativer Wert bestimmt, wobei angenommen wurde, daß bei einem starken Anstieg der Fluoreszenzintensität innerhalb weniger Pixel die Grenze einer markierten Struktur liegt. Diese Annahme ist insofern zutreffend, als durch die Dekonvolution der Hintergrund soweit reduziert wurde, daß die Intensitätsunterschiede zwischen Hintergrund und Signal so groß sind, sodaß die Grenze einer Struktur eindeutig bestimmt werden kann.

Der Schwellenwert für die Festlegung der beim Surface-Rendering im Isosurface Modul gezeichneten Oberfläche der markierten Strukturen wurde bei einem Anstieg der Fluoreszenzintensität innerhalb von 4 Pixeln um mindestens den dreifachen Wert definiert. Alle Fluoreszenzintensitäten, die über diesem Wert lagen, wurden dadurch als mit einer Struktur assoziiert definiert, während alle niedrigeren Fluoreszenzintensitäten nicht abgebildet wurden. Diese Definition führte zur Abbildung der gleichen Größe der Poliovirus-Vesikel wie im Elektronenmikroskop und bestätigte daher die Signifikanz dieser Beurteilung (Abb. 32). Die Größenmasstäbe in den Isosurface-Bildern der vorliegenden Arbeit gelten jeweils nur für den vorderen Bereich der Abbildungen, da die Bilder zur dreidimensionalen Darstellung gekippt wurden und sich daraus eine perspektivische Verzerrung der Bilder ergab.

Bestimmung der Kolo-kalisation

Die Bestimmung der Kolo-kalisation zweier Signale in den Präparaten wurde mit dem „Colocalisation“-Modul des Imaris-Software Pakets nach der Dekonvolution der Bildstapel des CLSM durchgeführt. Für die fehlerfreie Bestimmung der Kolo-kalisation ist essentiell, daß zuvor die Intensität der Hintergrundfluoreszenz und die Stärke des Durchblutens bestimmt werden. Die Hintergrundfluoreszenz eines Präparates und das Durchbluten der Fluorochrome sind Ursachen

für die Detektion falsch-positiver Kollokalisierung und mußten daher ausgeschlossen werden, um eine fehlerfreie Bestimmung der Kollokalisierung zweier Marker zu ermöglichen (Brelje et al., 1993). Für die Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz und des Durchblutens wurden Präparate mit den zu testenden Markern ausgewählt, die die stärksten detektierten Fluoreszenzintensitäten der Versuchsreihe zeigten. Alle weiteren Untersuchungen an Präparaten mit geringeren Fluoreszenzintensitäten zeigten entsprechend weniger Durchbluten, da der Anteil des Durchblutens proportional zur Intensität des Fluoreszenzsignals ist. In diesen Testpräparaten wurde ein maximales Durchbluten vom roten Cy3-Fluorochrom in den grünen Detektionskanal von 17% und vom grünen Cy2-Fluorochrom in den roten Detektionskanal von 10% gemessen, die jedoch nicht in den MIPs sichtbar war (Abb. 14a bis d). Diese Werte des Durchblutens wurden bei hoher Vergrößerung der einzelnen Bilder und in den korrespondierenden Histogrammen detektiert. Die Intensität der unspezifischen Hintergrundfluoreszenz war in allen Fällen maximal 6%. Diese Schwellenwerte wurden als Linien X (für Durchbluten) und B (für Hintergrund) in die entsprechenden Histogramme eingetragen (Abb. 14e und f). Da die Stärke des Durchblutens proportional zur Signalintensität der Fluorochrome steigt, der unspezifische Hintergrund jedoch bei allen Intensitäten konstant ist, kreuzen sich beide Linien bei 35% der maximalen Intensität des grünen Signals und bei 55% der maximalen Intensität des roten Signals (Abb. 14 e und f). Kollokalisierung wurde als signifikant bewertet, wenn die Signalintensitäten beider Fluorochrome innerhalb des selben Voxels über den Werten des Hintergrunds und des Durchblutens lagen. Das bedeutet, daß in den Histogrammen zur Bestimmung der Kollokalisierung alle Voxel markiert wurden, in denen die Intensitäten beider Fluorochrome höher waren als der Hintergrund und das Durchbluten. Diese Voxel wurden in den dekonvoluierten Bildstapeln gelb markiert und konnten durch die beschriebenen Darstellungsarten der dekonvoluierten Bilder auf ihre Verteilung in den markierten Strukturen untersucht werden.

Die beiden Abbildungen 14e und 14f zeigen zwei repräsentative Histogramme mit unterschiedlicher Kollokalisierung von je zwei Markern. Abbildung 14e zeigt ein Histogramm eines Bildstapels einer Poliovirus-infizierten Zelle, in dem die Marker p63 und 2B größtenteils getrennt sind, aber trotzdem einen geringen Anteil Kollokalisierung zeigen. In diesem Histogramm ist kein Durchbluten des grünen Signals in den roten Kanal zu detektieren (X-Achse). Das Durchbluten des roten Signals in den grünen Kanal war niedriger als der zuvor bestimmte maximale Wert von 17%, lag jedoch über dem Wert des Hintergrundsignals von 6% (Abweichung von der Y-Achse). Das Histogramm eines Bildstapels einer uninfizierten Zelle, in dem die COPII-Proteine Sec13 und Sec31 markiert wurden, zeigt eine deutliche Kollokalisierung dieser beiden Marker (Abb. 14f). Dort ist im Bereich der Fluoreszenzintensitäten zwischen den Schwellenwerten des Hintergrunds und des Durchblutens kein Signal zu finden. Aus diesem Grund konnte in einem solchen Bildstapel die Kollokalisierung auf den Wert der Hintergrundfluoreszenz festgesetzt werden.

2.7. Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Analysen und Aufnahmen wurden in einem CM-100 Elektronenmikroskop (Phillips CM100, Phillips Electronics N. V., Eindhoven, Niederlande) ausgerüstet mit einer Lanthan-Hexabromid-Kathode und einer Plattenkamera, durchgeführt. Die Emmissionsstärke der Kathode war bei allen Untersuchungen 100 kV, die Vergrößerungen wurden jeweils zwischen 720 und 34.000-fach gewählt.

Für die Transmissionselektronenmikroskopie wurden die untersuchten Zellpräparate in einen Kunstharz eingebettet und nach dessen Aushärtung Ultradünnschnitte davon angefertigt. Dazu wurden zwei verschiedene Methoden angewandt, die Einbettung in den Epon-Epoxidharz (Polysciences, Warrington, PA, USA), die optimale Strukturhaltung garantiert, sowie die Einbettung in den Acrylharz LR Gold (Polysciences, Warrington, PA, USA), die optimale Erhaltung von Proteinen und Nukleinsäuren für die Immundetektion ermöglicht. Die Epon-Einbettungen dienten zur Untersuchung der Ultrastrukturen der eingebetteten Zellen, während die parallelen LR Gold Einbettungen zur Darstellung der mit diesen Strukturen assoziierten viralen und zellulären Proteine verwendet wurde.

Einbettung in Epon-Epoxidharz

Da die einzubettenden Zellen ausschließlich als Monolayer-Kultur gezüchtet wurden, mußten diese für die Einbettung zunächst durch Trypsinisieren vom Boden der Zellkulturschale abgelöst werden. Die trypsinisierten Zellen wurden in Medium aufgenommen, resuspendiert und für 6 min bei 1400 rpm und 24°C pelletiert. Anschließend wurde das Zellpellet mit einem Skalpell zerkleinert und mit 2,5% Glutaraldehyd in 0,125M Cacodylatpuffer für 60 min bei 4°C fixiert. Die Glutaraldehyd-Lösung wurde weiter durch 2% Osmiumtetroxyd-Lösung in 0,125 M Cacodylatpuffer ersetzt und für weitere 30 min bei 4°C inkubiert. Für die anschließende Blockfärbung wurden die fixierten Zellen zunächst zweimal in 0,125 M Cacodylatpuffer und einmal in 75% Aceton gespült und dann das 75% Aceton gegen eine 2% Uranylacetatlösung in 75% Aceton ausgetauscht und für 20 min bis über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur Strukturhaltung wurden die Zellen nach der Blockfärbung schrittweise entwässert, indem diese nach zweimaligen Spülen mit 75% Aceton zweimal für 10 min mit 90% Aceton, dreimal für 20 min mit 100% Aceton und zweimal 15 min mit Propylenoxid bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Nach der Entwässerung fanden die folgenden Schritte ausschließlich in vollständig getrockneten Gefäßen statt. Die Herstellung der zwei benötigten Epon-Stammlösungen erfolgte, indem zunächst 50ml DDSA (Dodecyl Succine Anhydrid, Polysciences, Warrington, PA, USA) zu 31ml der Eponharzlösung gegeben wurden (Lösung A). Um Lösung B herzustellen, wurden 89ml DDSA zu 100ml Epon gegeben. Beide Stammlösungen wurden gut aber nicht zu schnell verrührt, bis keine Schlieren mehr zu sehen waren. Um die Epon-Gebrauchslösung herzustellen, wurden die Lösungen A und B im Verhältnis 3 : 7 zusammengegeben und ohne den Eintrag von Luftblasen vollständig gemischt bis keine Schlieren mehr zu sehen waren. Nun wurde der Polymerisationsbeschleuniger DMP30 (2,4,6 Tri-dimethylaminomethyl-Phenol, Polysciences) in 2%iger Endkonzentration zugegeben und die Lösung wieder vollständig aber nicht zu schnell gemischt. Zur Infiltration mit Epon wurden anschließend die Zellen mit einer 50% Lösung des fertigen Epon-Gemischs in Propylenoxid für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der zweite Schritt der Infiltration war eine Zugabe von einem weiteren Teil Epon zu der 50%igen Epon-Lösung (resultierte in einem Verhältnis von 1:2 Propylenoxid zu Epon) und eine anschließende Inkubation für 1,5 h bei Raumtemperatur.

Zur Einbettung der nun fixierten, entwässerten und infiltrierten Zellen wurde zunächst Epon-Gebrauchslösung in gereinigte und vollständig getrocknete Einbettungsformen gegeben, bis ein Meniskus über dem Rand der Form entstand. In die Mitte dieses Meniskus wurde jeweils ein Stück des Zellpellets aus der Infiltration gelegt. Während das Zellpellet zum Boden der Form sank, wurde das verbleibende Propylenoxid aus den Zellen entfernt. Die Formen mit den Einbettungen wurden anschließend in einem Ofen bei 60°C inkubiert, um das Epon während 48 h zu polymerisieren.

Nach dem Polymerisieren wurden die eingebetteten Zellpellets aus der Form gelöst, gesäubert und die zu schneidenden Bereiche der Einbettung mit einer Rasierklinge grob vorgeschritten („getrimmt“). Nach dem Trimmen wurden Ultradünnschnitte von den Zellen mit einem Diamantmesser auf einem Ultramikrotom (LKB Ultratome II 8800 mit Kontrolleinheit 8802A, LKB-Producter AB, Schweden) geschnitten. Die fertigen Schnitte wurden auf EM-Kupfernetzen aufgefangen (EMS, Electron Microscopy Sciences, München) und anschließend mit Reynold's Kontrastierlösung für 2 min unter Stickstoffatmosphäre (um eine Oxidation des enthaltenen Blei-Nitrats zu verhindern) kontrastiert. Nach der Kontrastierung wurden die Ultradünnschnitte im Elektronenmikroskop analysiert.

Einbettung in LR Gold-Acrylharz

LR Gold ist ein spezielles hydrophiles Einbettungsmedium für die Immunocytochemie. Es polymerisiert im Gegensatz zu Epon-Harz durch die Absorption von ultraviolettem Licht. Da die Polymerisierung des LR Gold ein exothermer Prozeß ist, wird diese bei einer Temperatur von -20°C durchgeführt, um eine Zerstörung der Antigene in den eingebetteten Zellen zu verhindern. Für die LR-Gold-Einbettung wurden zunächst - wie bei der Epon-Einbettung - die Zellen

trypsinisiert und für 6 min bei 1400 rpm und 24°C abzentrifugiert. Der erste Schritt der Einbettung ist die Fixierung, für die das Medium nach dem Zentrifugieren durch 2% Paraformaldehyd in Glukose/Pipes mit 50 mM Calcium und Magnesium (pH 7) ersetzt wurde. Anschließend wurden die Zellpellets mit dem Skalpell in kleinere Stücke geteilt, um eine bessere Durchsetzung mit dem Fixierungsmittel zu erreichen. Nach der Inkubation von 2 Stunden bei Raumtemperatur wurden die Zellen zweimal mit Glucose/Pipes ohne Calcium und Magnesium (0°C) gespült. Anschließend wurden die Zellen gefärbt, indem 0,2% Uranylcarbonat in Glucose/Pipes für 15 min auf die Zellpellets gegeben wurde und diese für 15 min bei 0°C inkubiert wurden. Nach erneutem zweimaligen Spülen mit Glukose/Pipes wurden die Aldehyde des Paraformaldehyds abgesättigt, damit diese später nicht zu einer unspezifischen Bindung der Antikörper führten. Dies wurde mit Ammoniumchlorid (NH_4Cl) in Glucose/Pipes und einer Inkubation für 15 min bei 0°C erreicht. Anschließend wurde erneut zweimal mit Glucose/Pipes-Lösung bei 0°C gespült. Die folgende Entwässerungsreihe wurde komplett bei 0°C durchgeführt, um die zu detektierenden Proteine möglichst vollständig zu konservieren. Dazu wurde die Glucose/Pipes-Lösung der fixierten Zellpellets zunächst mit 50% DMF (Dimethylformamid, Sigma, Buchs, Schweiz) in Glucose/Pipes ersetzt und diese für 30 min inkubiert. Dies wurde gefolgt von einer 30minütigen Inkubation mit 75% DMF in Glucose/Pipes und einer weiteren 30minütigen Inkubation mit 90% DMF in Glucose/Pipes. Zur Infiltration der Zellen wurde die 75% DMF-Lösung zunächst durch eine 50% LR-Gold-Lösung in DMF ersetzt und bei 0°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 min bei 0°C mit 70% LR-Gold-Lösung in DMF inkubiert und diese dann gegen 100% LR-Gold Lösung ohne Beschleuniger ersetzt und für 45 min bei 0°C inkubiert. Die Infiltration wurde vervollständigt, indem diese Lösung durch eine 100% LR-Gold Lösung mit Beschleuniger (0,5% Benzol Ethyl Ether) ersetzt wurde und über Nacht bei -10°C im Dunkeln inkubiert wurde. Am nächsten Morgen wurde diese Lösung noch einmal ausgetauscht und die Zellen für eine Stunde bei -10°C im Dunkeln inkubiert. Zur Einbettung wurden die Zellpellets in Gelatine-Kapseln überführt, die mit 100% LR-Gold-Lösung (inkl. 0,5 Benzoin Ethyl Ether) gefüllt waren. Die Polymerisierung des LR-Gold Harz wurde für 48 Std. bei -20°C unter UV-Bestrahlung durchgeführt. Nach der Polymerisierung wurden die Gelatinekapseln auf Raumtemperatur erwärmt, gereinigt und getrimmt. Wie bei den Epon-Einbettungen wurden Ultradünnschnitte der Zellpellets mit einem Diamantmesser auf einem Ultramikrotom (LKB Ultratome II 8800 mit Kontrolleinheit 8802A, LKB-Producter AB, Schweden) geschnitten, hier aber auf EM-Goldnetzen aufzufangen. Die Immunreaktion wurde direkt an den Ultradünnschnitten auf den Goldnetzen durchgeführt.

Immuncytochemie

Die Immunreaktionen zur Detektion von Proteinen auf Ultradünnschnitten in LR-Gold-eingebetteten Zellen wurden in einer mit Wasserdampf gesättigten Kammer bei Raumtemperatur durchgeführt. Zunächst wurden unspezifische Bindungsstellen der Antikörper im Präparat durch die Inkubation mit 5% n-goat Serum in TBS (mit 0,1% BSA) abgesättigt. Anschließend wurden die Schnitte mit der ersten Antikörper-Verdünnung inklusive 1% n-goat Serum, für 60 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Schnitte in TBS/BSA-Lösung auf dem Schüttler bei 120 rpm für je 5 min wurden die Schnitte mit einem sekundären Ziege anti Maus (goat anti mouse, GAM) oder mit einem Ziege anti Kaninchen (goat anti rabbit, GAR) Antikörper in der Verdünnung 1:20 in TBS/BSA-Lösung inkubiert. Diese sekundären Antikörper waren an Goldkörner von 5, 10 oder 15 nm Durchmesser gekoppelt, die im Elektronenmikroskop als distinkte dunkle Punkte erscheinen, da Gold elektronendichter ist, als die zellulären Bestandteile. Nach der Inkubation mit dem Konjugat wurde wiederum zweimal für 5 min in TBS/BSA-Lösung gewaschen und anschließend mit H_2O dest. gespült. Die Schnitte wurden nach der Immunreaktion fixiert bzw. kontrastiert. Dazu wurden die Schnitte zur Fixierung zunächst für 15 min mit 2% Glutaraldehyd in PBS inkubiert und anschließend zweimal mit H_2O dest. gewaschen. Die Schnitte wurden weiterhin für 15 min in 4% Uranylacetat in H_2O dest. und nach weiterem zweimaligen Waschen in PBS mit Millonig's-Lösung für 2 min kontrastiert. Nach einem abschließenden Waschschrift in H_2O dest. wurden die Goldnetze bis zur Betrachtung im Elektronenmikroskop unter Vakuum im Exsikkator mit Silicagel aufbewahrt.

Präparation von Trägernetzen und Kontrastierlösungen für die Elektronenmikroskopie

Die Gold- und Kupfernetze für die Elektronenmikroskopie dienten als Träger für die Ultradünnschnitte, die direkt nach dem Schneiden mit dem Ultramikrotom auf diesen gesammelt wurden. Vor der Verwendung als Träger der Dünnschnitte mußten die Netze zunächst gewaschen und mit einem Trägermaterial befilmt werden. Dazu wurde eine 2%ige Parlodion-Lösung in Amylazetat (Sigma, Buchs, Schweiz) eingesetzt, die direkt auf die Trägernetze aufgebracht wurde und nach dem Trocknen einen Film darauf bildete. Um den Film auf den Trägernetzen zu stabilisieren, sodaß dieser auch im Elektronenstrahl des Mikroskops nicht zerstört wurde, wurden die befilmten Netze anschließend beglimmt. Dazu wurden Benzoldämpfe unter Hochvakuum durch eine Hochspannung verrußt, die an zwei Elektroden angelegt wurde. Durch die Platzierung der EM-Netze zwischen den Elektroden wurde bei diesem Vorgang der Benzol-Ruß auf die Trägerschicht der EM-Netze aufgebracht. Die befilmten und beglimmten Gold- oder Kupfernetze wurden anschließend auf ihre Verwendbarkeit im Elektronenmikroskop, noch vor dem Aufbringen der Dünnschnitte untersucht. Dabei war es für die Verwendbarkeit der Netze von entscheidender Bedeutung, daß die Trägerschicht weder Verunreinigungen oder ungleichmäßigen Auftrag des Phenolrußes noch Löcher oder Falten in der Trägerschicht aufwies. Geprüfte EM-Netze wurden bis zu ihrer Verwendung unter Vakuum im Exsikkator mit Silicagel aufbewahrt.

Herstellung von Reynold's-Kontrastierlösung

1,33 g Bleinitrat $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Merck) und 1,76 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Merck) wurden in je 15 ml ausgekochtes H_2O gegeben und unter N_2 -Atmosphäre gerührt, bis sich beide Substanzen vollständig gelöst hatten. Beide Lösungen wurden nun unter N_2 -Atmosphäre zusammengegeben und 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Zu dieser milchigen Lösung wurden anschließend 8 ml 1N NaOH gegeben, sodaß sich der Niederschlag des Bleinitrats lösen konnte. Die Lösung wurde nun in ein neues Gefäß filtriert um ungelöste Rückstände zu eliminieren und dann unter N_2 -Atmosphäre bis zur Verwendung für die Kontrastierung von Epon-Schnitten aufbewahrt.

Herstellung von Millonig's Kontrastierlösung

Zunächst wurde eine Vorratslösung aus 5 g NaOH und 0,25 g K-Na-Tartrat gelöst in 12,5 ml hergestellt, die unter N_2 -Atmosphäre aufbewahrt wurde. Zur Herstellung der 20% Bleiacetat-Lösung wurden dann 1 g Blei-II-Acetat-Trihydrat ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, Merck) in 5 ml ausgekochtes H_2O dest. gegeben. Dazu wurde dann zuerst 1 ml der erwähnten Vorratslösung und sofort danach 66 ml ausgekochtes H_2O dest. zugegeben. Diese Lösung wurde nach intensivem Rühren in Reagenzgläser filtriert und bei 3000 rpm und Raumtemperatur für 10 min abzentrifugiert. Vor der Verwendung für die Kontrastierung von LR-Gold-Immuneinbettungen wurde die fertige Millonig's-Lösung für mindestens drei Tage bei Raumtemperatur belassen, um eine eventuell auftretende Präzipitation des Bleiacetat detektieren zu können.

2.8. Material

Mikroskopie und Bildbearbeitung

- Elektronenmikroskop Philips CM100 (Phillips Electronics N. V., Eindhoven, Niederlande) ausgerüstet mit einer Lanthan-Hexabromid-Kathode und Plattenkamera. Emmissionsstärke der Kathode: 100 kV, Vergrößerungen: 720 - 39.000-fach.
- Ultramikrotom LKB Ultratome II 8800 mit Kontrolleinheit 8802A, LKB-Producter AB, Schweden
- Kühltruhe mit 458 nm UV-Licht zur LR-Gold-Einbettung, Gijsemann Aparatbau, Basel, Schweiz
- Inkubator zur Epon-Einbettung, Julabo Biotherm 37, Julabo, Seelbach
- Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskop Nikon Eclipse E800, 100 W Quecksilberlampe, mit Filtern zur Detektion von FITC (Cy2), TexasRed (Cy3) und Dapi, Nikon Kamera mit Belichtungsautomat.

- Scanning Laser Confocal Microscope: Leica TCS4D (Leica Lasertechnik, Heidelberg) mit Argon/Krypton Laser, der Licht der Wellenlängen 488, 568 und 647 nm emittierte. Objektiv-Linse: Leica 100x/nA 1.4. Filter zur Detektion von FITC (Cy2), TexasRed (Cy3), Rhodamin, Cy5 und Dapi. Mikrotisch mit elektronisch gesteuerter Piezomotoreinheit.
- Umkehrmikroskop für die Zellkultur: Olympus CK2 (Olympus, Schwerzenbach, Schweiz), Objektiv-Linse: Olympus 20x/nA 0.40 - Phasenkontrast
- Silicon Graphics Workstation O2 (Mountainview, CA, USA) zur Dekonvolution und Bildbearbeitung, ausgerüstet mit folgender Software:
 - Imaris 2.1 sowie Imaris 3, Bitplane, Zürich, Schweiz
 - Colocalisation-Modul Imaris, Bitplane, Zürich, Schweiz
 - Huygens2-Modul, Bitplane, Zürich, Schweiz
 - ISOsurface-Modul, Bitplane, Zürich, Schweiz
 - Mediarecorder, Bitplane AG, Zürich, Schweiz
- Weitere Bildverarbeitung: Apple Macintosh G4, Betriebssystem Mac OS 9.2, Software zur Bildbearbeitung: NIH Image 1.6.2, Adobe Photoshop 4.0.1, Adobe Illustrator 7.0.1
- Photomaterial:
 - Schwarz/weiß-Negativfilm für die Lichtmikroskopie: Kodak TMAX 400pro (Kodak AG, Rochester, N. Y. / USA)
 - Schwarz/weiß-Negativfilm für die Plattenkamera des Elektronenmikroskops: Kodak ESTAR 4489 (Thick Base) (Kodak)
 - Schwarz/weiß-Papier für Abzüge: Polymax II RC F (Kodak)
 - Entwickler für Kleinbild-Negativfilme: D-76 (Kodak)
 - Entwickler für EM-Negativfilme: D-19 (Kodak)
 - Entwickler für Papierabzüge: Tetenal Dokumol (Tetenal Photowerk AG, Norderstedt)
 - Fixierer für Kleinbild-Negativfilme: Hypam Fix (Ilford Imaging, Mobberley, UK)
 - Fixierer für EM-Negativfilme: Hypam Fix (Ilford Imaging)
 - Fixierer für Papierabzüge: Tetenal Eukobrom (Tetenal Photowerk AG)
 - Vergrößerer für Papierabzüge: Eurogon (Industria Fototecnica, Firenze, Italien)

Reagenzien und Substanzen

Die Reagenzien und sonstigen Substanzen, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden und den gängigen Rezepturen entsprechen, sind nicht näher beschrieben, da sie den üblichen Publikationen entnommen werden können (siehe z. B.: Sambrook, Fritsch and Maniatis „Molecular Cloning“, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Pound J. D. „Immunochemical Protocols“, 2nd Edition, Methods in Molecular Biology, Vol 80, Humana Press, Totowa, Bienz et al., 1994; Egger et al., 1999).

Diese Reagenzien werden mit den üblichen Bezeichnungen im Text der vorliegenden Arbeit angegeben. In diesem Kapitel sind ausschließlich Reagenzien beschrieben, die nicht den gängigen Rezepturen entsprechen bzw. nicht publiziert wurden.

- Sofern nicht näher bezeichnet oder gesondert angegeben, wurden die verwendeten Chemikalien von folgenden Firmen bezogen:

Amersham-Pharmacia-Biotech, Huntingdon, UK
ams Biotechnology, Bioggio-Lugano, Schweiz
Becton Dickinson AG, Allschwil, Schweiz
Berna AG, Bern, Schweiz
Catalys AG, Wallisellen, Schweiz
Dianova GmbH, Hamburg
DAKO AG, Zug, Schweiz
EMS GmbH, München
Greiner Labortechnik, Huber und Co AG, Reinach, Schweiz
Juro Supply AG, Luzern, Zürich
Ilford AG, Fribourg, Schweiz
Inotech AG, Dottikon, Schweiz
Invitrogen AG, Basel, Schweiz
Life Technologies, Basel, Schweiz
Merck AG, Dietikon, Schweiz
Milan Analytika AG, Liestal, Schweiz
Ott und Wyss AG, Zofingen, Schweiz
Roth AG, Karlsruhe
Seromed / Oxoid, Basel, Schweiz
Sigma, Buchs, Schweiz
Schleicher und Schüll, Kriens, Schweiz
Stratagene, Basel, Schweiz
Tecnomara AG, Wallisellen, Schweiz

- Glycerin/Dabco

TRIS-Puffer	100mM
Glycerin	33,3% (v/v)
DABCO	2,5% (w/v)

- Mowiol/NPG

Tris-Puffer (0,05M, pH 7,5)
Glycerin 50%
Mowiol 6% (w/v)
=> pH 7,5
NPG 1% (w/v)
=> pH 7

- Trypsin / EDTA Lösung (Biochrom AG, Berlin)

Trypsin	0,05% (w/v)
EDTA	0,02% (w/v)

in PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺

- LL-Puffer (L. Landmann, persönliche Mitteilung)

NaCl	137 mM
KCl	5 mM
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	1.1 mM
KH ₂ PO ₄	0,4 mM
Glucose	5,5 mM
NaHCO ₃	4mM
MgCl ₂	2mM
EGTA	2mM
MES	5mM
=> pH	6,5

3. Ergebnisse

3.1. Auswahl der Zelllinie und des Virus-Stamms für die Immunfluoreszenz

Die Auswahl der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinie stellte eine wichtige Vorbedingung für die späteren experimentellen Ansätze zur Beantwortung der Fragestellungen dieser Arbeit dar. Das erste Kriterium für die Auswahl der Zellen war deren Infizierbarkeit mit Poliovirus. Ausschließlich bei Zellen, die den Poliovirus-Rezeptor CD155 exprimieren, kommt es zu einer Aufnahme des Virus. Die mit Poliovirus infizierbaren Zelllinien sind hauptsächlich humaner, teils auch simianer Herkunft. Für die Untersuchung des Ursprungs der Poliovirusvesikel in dieser Arbeit sollte eine Zelllinie ausgewählt werden, die eine möglichst gute Darstellung der als Ursprung der Poliovirus-Vesikel vermuteten Organellen, des ER sowie des Golgi ermöglichte. Da diese Untersuchungen mit Hilfe von Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt werden sollten, wurden verschiedene Zelllinien in der Immunfluoreszenz getestet, bei denen jeweils das ER durch den Nachweis des Membranproteins p63 (siehe Kapitel 3.5. „Auswahl der Marker für das endoplasmatische Retikulum“) und dem Marker für Poliovirusvesikel, dem Protein 2B, detektiert wurden. Diese Kombination wurde gewählt, da die Detektion einzelner Vesikel im Vergleich mit dem komplexen Netzwerk des ER zur Beantwortung der Frage nach der Herkunft der Poliovirus-Vesikel führen sollte und da diese Kombination eine besondere Herausforderung an das experimentelle System stellte (siehe unten). Zur Auswahl standen dabei die folgenden Zelllinien: HeLa, FRhK-4, BSC-1, CV-1, Hep-2, sowie BT7-H.

Diese Experimente ergaben, daß fibroblastische Zellen besonders gut für die Untersuchung im Mikroskop geeignet waren, da sie in der Monolayer-Zellkultur eine ausgebreitete, flache Form annehmen. Die netzartigen Strukturen des ER konnten gut in der Immunmarkierung dargestellt werden, da in flachen Zellen weniger Strukturen übereinander lagen. Die Zelllinien BSC-1, BT7-H sowie CV-1 waren für die Darstellung des ER besser geeignet als die anderen getesteten Zelllinien, die eine abgerundete Morphologie hatten, wodurch eine Darstellung des ER in der Immunfluoreszenz erschwert wurde.

Besonders die üblicherweise in der Forschung mit Poliovirus und anderen Picornaviren verwendeten humanen Krebszellen HeLa sind abgerundet und höher als andere fibroblastische Zellen. Bei solchen Zellen liegen eine Vielzahl von Strukturen übereinander und relativ nahe am Kern, wodurch sich diese Zellen nicht gut für die Untersuchung der Kollokalisierung zweier stark unterschiedlich geformter Strukturen, wie dem ER und den Poliovirus-Vesikeln eignen. Zusätzlich würde durch eine höhere Anzahl optischer Schnitte in der Z-Achse in der konfokalen Mikroskopie und der 3D-Rekonstruktion von stark abgerundeten Zellen der Zeitaufwand beim Dekonvolvieren der Bildstapel unverhältnismäßig groß.

Die Zelllinien BSC-1, BT7-H sowie CV-1 wurden mit Immunfluoreszenzanalysen im konventionellen Fluoreszenzmikroskop genauer untersucht und es wurde bei diesen neben der

Markierung des ER auch eine Markierung des Golgi-Apparates durchgeführt. Dabei erwiesen sich die Zelllinien BSC-1 und BT7-H als am besten für die Immunfluoreszenz geeignet, da sich das ER, der Golgi-Apparat und die Verteilung der viralen Proteine darin gut darstellen ließen.

Die BT7-H Zellen wiesen noch einen weiteren Vorteil gegenüber den anderen getesteten Zellen auf. BT7-H Zellen stammen von der Zelllinie BSC-1 ab, unterscheiden sich jedoch von dieser durch die stabile Transfektion des Plasmids pOS2, das das Gen für die RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 trägt (Whetter et al., 1994). Die RNA-abhängige RNA-Polymerase T7 transkribiert alle DNAs in mRNAs, die unter der Kontrolle des T7-Promotors stehen. Neben dem Gen für die T7-Polymerase befindet sich auf dem Plasmid pOS2 noch ein Resistenzgen für Genitacin als Selektionsmarker. Solange die Zellen in Medium mit dem Antibiotikum Genitacin kultiviert werden, wird neben dem Resistenzgen auch die T7-Polymerase in deren Cytoplasma exprimiert. Dies hat den Vorteil, daß die BT7-H Zellen nach der Transfektion mit einem Plasmid, dessen ORF unter der Kontrolle des T7-Promotors steht, die darauf codierten Gene exprimieren können, ohne daß die T7-Polymerase - wie sonst üblich - durch ein rekombinantes Vaccinia-Virus mittels einer Infektion in die Zelle gebracht werden muß. Dies war von essentieller Bedeutung für die vorliegende Arbeit, da bei Untersuchungen der Auswirkungen einzelner viraler Proteine nicht ausgeschlossen werden konnte, daß das rekombinante Vaccinia-Virus Artefakte erzeugt, da es in den Stoffwechsel der Wirtszelle eingreift und, wie Poliovirus, Membranveränderungen induzieren kann.

Die Untersuchungen der Poliovirusinfektion in BT7-H Zellen wurden zunächst mit Poliovirus Mahoney1, also dem Wildtyp des Virus durchgeführt, da die Mehrzahl der bisherigen Ergebnisse zur Vesikelbildung durch Poliovirus in diesem System gewonnen wurden. Jedoch wurde zu Beginn des Projektes durch die WHO im Rahmen des weltweiten Polio-Eradikationsprogramms, ein enger Zeitplan für die Eliminierung von Wildtyp-Poliovirus aus den Forschungslabors erstellt, um einen möglichen Eintrag des Wildtyp-Virus in die Bevölkerung und dessen erneute Zirkulation zu verhindern. Damit nicht während des Projekts das Virus gewechselt werden musste, wurde schon in dessen Anfangsphase auf die Verwendung von Poliovirus Sabin1, dem Vakzinastamm der OPV umgestellt. PV Sabin1 ist in der Zellkultur ebenso infektiös wie der Wildtyp, im Gegensatz zu diesem ist Poliovirus Sabin1 jedoch nicht neurotrop. Die Replikation des Sabin1-Stamms verläuft in Zellkulturen identisch zu denen des Wildtyp-Virus, weshalb sich der Impfstamm zur Verwendung im Labor während einer längeren Übergangsphase der schrittweisen Eradikation von Poliovirus gut eignet.

3.2. Synchronisierung der Infektion von Poliovirus Sabin1 in BT7-H Zellen

Bei den ersten Versuchen BT7-H Zellen mit PVS1 zu infizieren, fiel auf, daß die Infektion der Zellkulturen asynchron verlief. Zu frühen Zeiten der Infektion (3.30 hpi) wurden maximal 30 bis 40% positive Zellen in der Kultur beobachtet. Zunächst wurde vermutet, daß der Grund dafür eine inhomogene Expression des Poliovirusrezeptors CD155 in der Zellkultur sein könnte. Das hieße, entweder nicht alle Zellen der im Experiment infizierten Kultur exprimierten den Poliovirusrezeptor auf ihrer Oberfläche, oder die Mengen des CD155 variierten stark von Zelle zu Zelle. Beides hätte zu Unterschieden beim Aufnahmevermögen des Virus durch die Zellen geführt und sich in einer asynchronen Infektion oder reduzierten Infektionseffizienz niedergeschlagen. Um diese Frage zu beantworten, wurde die Zellkultur, zur Konservierung der Oberflächenproteine, nativ in PBS mit einem Antikörper gegen CD155 und einem GAM Cy3-Konjugat markiert und - ebenfalls in PBS eingedeckt - im Mikroskop untersucht. Abbildung 15 zeigt, daß alle Zellen der Kultur eine gleichmäßige Expression von CD155 auf ihrer Oberfläche aufweisen. Die Asynchronität der Infektion in den beschriebenen Versuchen resultiert also nicht aus einer inhomogenen Expression des Poliovirusrezeptors in der BT7-H Zellkultur.

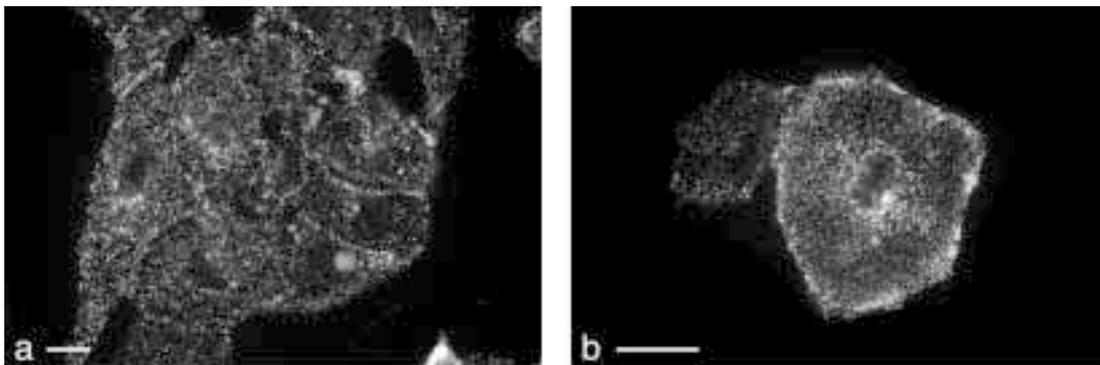


Abb. 15: Expression des Poliovirusrezeptors CD155 von BT7-H Zellen. Uninfizierte BT7-H Zellen wurden nativ mit einem Antikörper gegen CD155 inkubiert, mit einem Cy3-Konjugat markiert und in PBS eingedeckt im konventionellen Epifluoreszenzmikroskop untersucht. In der Übersicht ist die gleichmäßige Expression des CD155 in allen Zellen der Kultur zu sehen (a). In besonders stark ausgebreiteten Zellen konnte eine Vielzahl der punktförmigen Signale der Markierung des CD155 auf der Plasmamembran detektiert werden (b). Maßstäbe: 20 µm (a und b).

Eine verbliebene Erklärungsmöglichkeit für den asynchronen Verlauf der Infektion waren experimentelle Ungenauigkeiten bei der Infektion der Zellkultur. Um eine höhere Infektionseffizienz und die Synchronisierung der Infektion zu erreichen, wurden daher die zwei folgenden Veränderungen des Vorgehens der Infektion eingeführt. Zunächst wurde die Anzahl der Viruspartikel pro infizierter Zelle von 30 PFU (für plaque forming units, also infektiöse Viruspartikel)

pro Zelle auf 200 PFU erhöht. Dadurch wurde sichergestellt, dass jede einzelne Zelle durch mehrere Viren infiziert wurde. Weiterhin wurde der Beginn der Infektion nicht - wie zuvor - bei 37°C durchgeführt, sondern eine Adsorption des Virus bei 0°C für 45 min vorgeschaltet. Bei 0°C kann Poliovirus zwar an den Poliovirusrezeptor der Wirtszelle binden, aber die endocytotischen Prozesse der Zelle sind bei dieser Temperatur unterbunden. Daher ermöglichte die Inkubationszeit bei 0°C, bei gelegentlichem Bewegen der Zellkulturschale zur Verteilung des Virus, eine Adsorption großer Mengen Virus an die Zellen. Nachdem die Zellen anschließend auf 37°C transferiert wurden, begannen die Vorgänge der zellulären Endocytose erneut, wodurch auch eine größere Anzahl Viren aufgenommen wurde. Die Infektion der Zellen war damit in Bezug auf die Aufnahme des Virus weitgehend synchronisiert. Der Beginn der Zeitnahme der Infektion wurde beim Transfer der Zellkultur auf 37°C festgesetzt, eine Zellkultur 3.30 h nach der Infektion befand sich also bereits bei 4.15 h nach Beginn der Adsorption.

Mit den beschriebenen Methoden ließ sich die Infektionsrate - detektiert 3.30 h nach Ende der Adsorption - auf über 60% anheben, die Infektion blieb aber weiterhin leicht asynchron, was jedoch für die Fragestellungen dieser Arbeit von Vorteil war (siehe unten).

3.3. Zeitverlauf der Infektion von PV Sabin1 in BT7-H Zellen

Da es sich bei der Infektion von Poliovirus Sabin1 in BT7-H-Zellen um ein noch nicht etabliertes System zur Untersuchung der frühen Stadien der Poliovirus Replikation handelte, musste zunächst der Verlauf der Infektion und Replikation des Poliovirus in diesen Zellen untersucht werden. Dazu wurde sowohl der Zeitverlauf der Bildung von Poliovirus Vesikeln im Elektronenmikroskop dargestellt, als auch der Verlauf der Detektion des viralen Vesikelmarkers 2B in Immunfluoreszenzanalysen untersucht. Weiterhin wurde die Kinetik der zellulären und viralen Proteinsynthese nach der Infektion getestet um Anhaltspunkte für die frühesten Zeiten der Vesikelbildung zu erhalten.

Untersuchung des Verlaufs der Poliovirus-Infektion im Elektronenmikroskop

Bereits in früheren Untersuchungen wurde beschrieben, daß die ersten im Elektronenmikroskop erkennbaren Veränderungen einer mit Poliovirus infizierten Zelle die Entstehung kleiner, als „Cluster“ bezeichnete Nester von wenigen Vesikeln sind (Bienz et al., 1983). In der Übersicht im Elektronenmikroskop der Abbildung 16a ist eine BT7-H Zelle 3.30 h nach der Infektion mit Poliovirus Sabin1 gezeigt. Die Pfeile weisen auf die ersten Cluster von wenigen Vesikeln hin, die zu diesen frühen Zeiten der Infektion in den infizierten Zellen zu finden sind. Die Vesikel-Cluster liegen über das ganze Cytoplasma verteilt vor, treten jedoch häufiger in den perinukleären Bereichen der infizierten Zellen auf. Auffällig ist, daß die Vesikel-Cluster bei ihrem ersten Auftreten häufig in der Nähe der Membranen des ER lokalisiert sind (siehe Einschubbild, Abb. 16a).

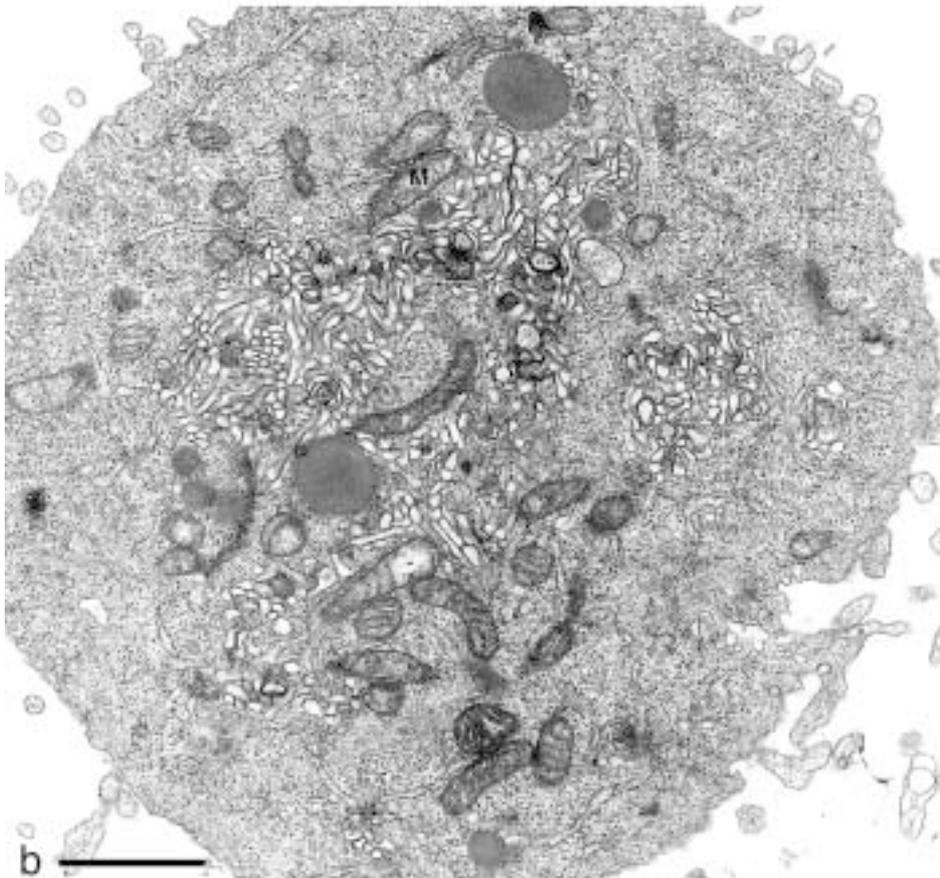
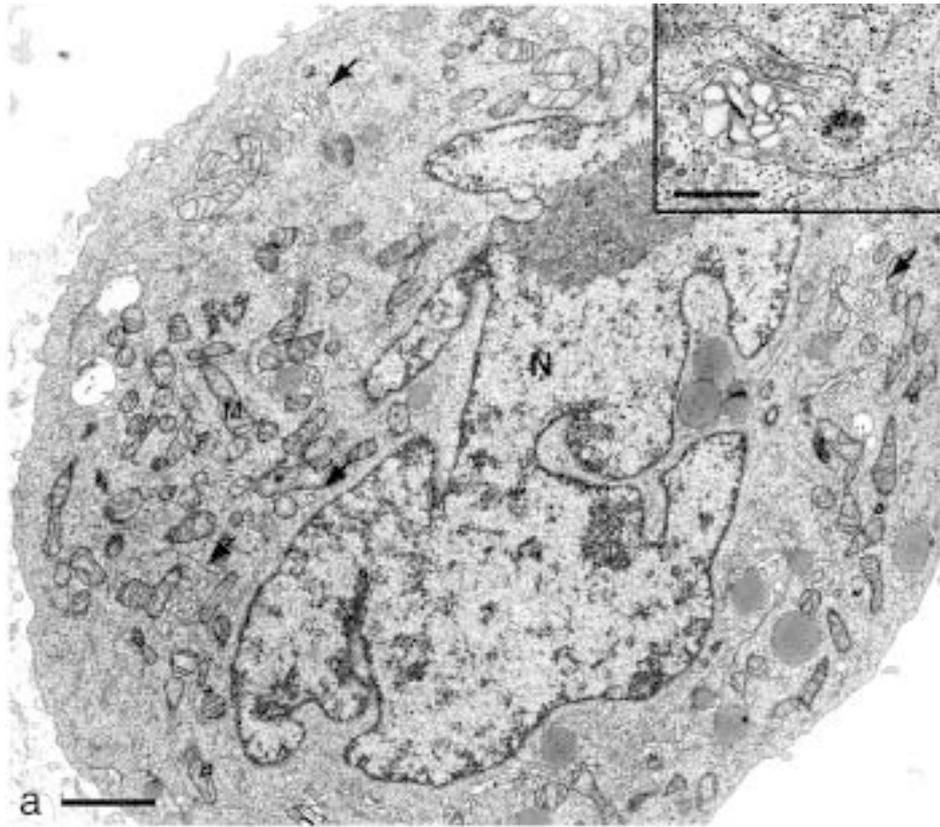


Abb. 16

Abbildung 16b zeigt eine Zelle 4.30 h nach der Infektion mit Poliovirus Sabin1. Hier ist deutlich zu sehen, daß die Poliovirus-Vesikel bereits einen großen Teil des Cytoplasmas einnehmen. Die einzelnen Cluster gehen zu diesem Zeitpunkt bereits ineinander über und es entsteht ein großes Vesikelfeld in der Zelle, das nicht wie die initialen Clusters auch in der Peripherie der Zelle lokalisiert ist, sondern im Zentrum der Zelle, nahe des Kerns, der in dieser Abbildung nicht zu sehen ist.

Die Vesikel zeichnen sich - wie in früheren Studien belegt (Dales et al., 1965; Bienz et al., 1987; Egger et al., 2001) - dadurch aus, daß sie dicht miteinander assoziiert sind, sodaß ihre Membranen (zwei Lipiddoppelschichten) oft zu einer Fusionsmembran aus drei Lipidschichten fusionieren. In den frühen Phasen der Infektion von BT7-H Zellen wurden ausschließlich einzelne Vesikel gefunden. Abb. 17a zeigt einen Ausschnitt des Cytoplasmas einer infizierten Zelle 2.30 h nach Infektion. Es sind eine Anzahl kleiner Vesikel von ca. 100 bis 200 nm Größe zu erkennen, die verstreut im Cytoplasma liegen und nicht mit anderen Vesikeln assoziiert sind (Pfeile in Abb. 17a). Diese isolierten Vesikel waren mit den hier verwendeten Methoden nicht als Poliovirusvesikel zu identifizieren, da sie sich morphologisch nicht von zellulären Vesikeln gleicher Größe unterschieden. Die ersten Vesikel-Cluster, die aus wenigen Vesikeln bestehen und durch ihre Fusionsmembranen eindeutig als Poliovirus Vesikel zu identifizieren sind, wurden ab 3 Stunden nach der Infektion, verteilt im Cytoplasma der Zelle gefunden. Abb. 17b zeigt ein Cluster von Poliovirus-Vesikeln in einer Zelle zu diesem Zeitpunkt. Auffällig ist auch hier die Nähe der Vesikel zu den Membranen des endoplasmatischen Retikulums. Die Vesikel haben einen Durchmesser von 100 bis 300 nm, die etwa der Größe der zuvor für die Poliovirus-Infektion publizierten Vesikel entspricht (Dales et al., 1965; Bienz et al., 1987; Egger et al., 2001; Suhy et al., 2001). Oftmals findet sich zu diesem Zeitpunkt nur ein einziges dieser Vesikel-Cluster in einem Schnitt einer Zelle. Ein Teil der Zellen zeigte zu diesem Zeitpunkt keine Vesikel-Cluster, was einerseits durch eine leichte Asynchronität der Infektion, andererseits durch die Tatsache bedingt war, daß bei Ultradünnschnitten nur jeweils ein Bruchteil der Ausdehnung der Zelle in der Z-Achse im Elektronenmikroskop dargestellt werden konnte.

Im weiteren Verlauf der Infektion nach der Bildung der ersten Vesikel-Cluster stieg die Größe dieser Cluster an, da die Anzahl der Vesikel in diesen zunahm. Weiterhin fanden sich pro infizierter

Abb. 16: Verlauf der Poliovirus-Infektion in BT7-H Zellen im Elektronenmikroskop - Übersicht. BT7-H Zellen wurden mit Poliovirus Sabin1 infiziert und in Epon-Harz eingebettet. In den frühen Phasen der Infektion (3.30 hpi) bilden sich verteilt im Cytoplasma kleine Nester („Cluster“) von eng assoziierten Poliovirus-Vesikeln (a, Pfeile; Maßstab: 2 µm). Auffallend ist die häufige Asoziation der Vesikel-Cluster mit den Membranen des ER (Einschubbild, Maßstab: 0,5 µm). In c ist eine Zelle 4.30 hpi gezeigt, in der die Menge der Vesikel und die Größe der Cluster deutlich zugenommen haben, der Nukleus liegt außerhalb der Ebene dieses Dünnschnitts (Maßstab: 2 µm). N = Nukleus, M = Mitochondrien, Pfeile: Vesikel-Cluster.

Zelle mehrere getrennte Vesikel-Cluster unterschiedlicher Größe. Abbildung 17c zeigt nebeneinander liegende, noch recht kleine Vesikel-Cluster, die wiederum häufig mit Membranen des ER assoziiert sind. Mit dem Fortschreiten der Infektion akkumulierten immer mehr Vesikel im Cytoplasma der infizierten Zellen. Jedoch ist in dieser Abbildung ebenfalls zu erkennen, daß auch zu diesem Zeitpunkt noch einzelne Vesikel gebildet werden. Die Bildung der Poliovirus-Vesikel ist also ein kontinuierlicher Vorgang, der jedoch zu verschiedenen Zeiten der Infektion neu initiiert werden kann. Als nächsten Schritt erkennt man, wie nebeneinanderliegende Vesikel-Cluster mehr Raum im Cytoplasma der infizierten Zelle einnehmen, so ist in Abbildung 17d zu erkennen, daß die Menge der Vesikel pro Cluster zugenommen hat. Es fällt auf, daß die Form der Vesikel in den infizierten BT7-H Zellen variabel war und teils von der zuvor für Poliovirus beschriebenen ausschließlich runden Form abwich. So waren in BT7-H Zellen neben den typischen runden Vesikeln auch längliche Poliovirus-Vesikel mit einer eher tubulären Morphologie vorhanden (Dieses Phänomen wird im Kapitel 1.4. genauer besprochen). Im weiteren Verlauf der Infektion gingen die einzelnen Cluster zunehmend ineinander über und füllten große Bereiche des Cytoplasmas aus. Abbildung 17e zeigt einen Schnitt durch eine PVS1-infizierte BT7-H Zelle 4.30 h nach der Infektion. Die Vesikel sind eng miteinander assoziiert, nun aber über einen großen Bereich des Cytoplasmas verteilt. Die Form der Vesikel variiert auch hier von kleinen abgerundeten zu größeren, tubulären Vesikeln. Es konnte jedoch mit dieser Methode keine endgültige Aussage über die Form der Vesikel gemacht werden, da es sich bei der Ansicht der Vesikel um Dünnschnitte handelte, die in den zufällig orientierten Vesikel entweder Quer-, Längs-, oder Diagonalschnitte repräsentieren konnten. Daher konnte nur die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte dreidimensionale Untersuchung Aufschluß über die tatsächliche Form der Poliovirus Vesikel geben.

Die Entwicklung der Membranveränderungen in der Poliovirus-Infektion in BT7-H Zellen verläuft in der gesamten Kultur trotz der oben beschriebenen Maßnahmen nicht vollständig synchron. Außerdem sind die Grenzen zwischen den Größen der Vesikel-Cluster und der Menge der Vesikel bzw. Cluster fließend, daher repräsentieren die gezeigten Bilder Momentaufnahmen eines kontinuierlichen Prozeß der viralen Replikation in der infizierten Zelle. Die Zeitpunkte 3 hpi und 3.30 hpi waren für die Untersuchung der Entstehung der Poliovirus-Vesikel im Elektronenmikroskop gut geeignet um eine Lokalisierung der Entstehung der Poliovirus-Vesikel früh in der Infektion zu ermöglichen.

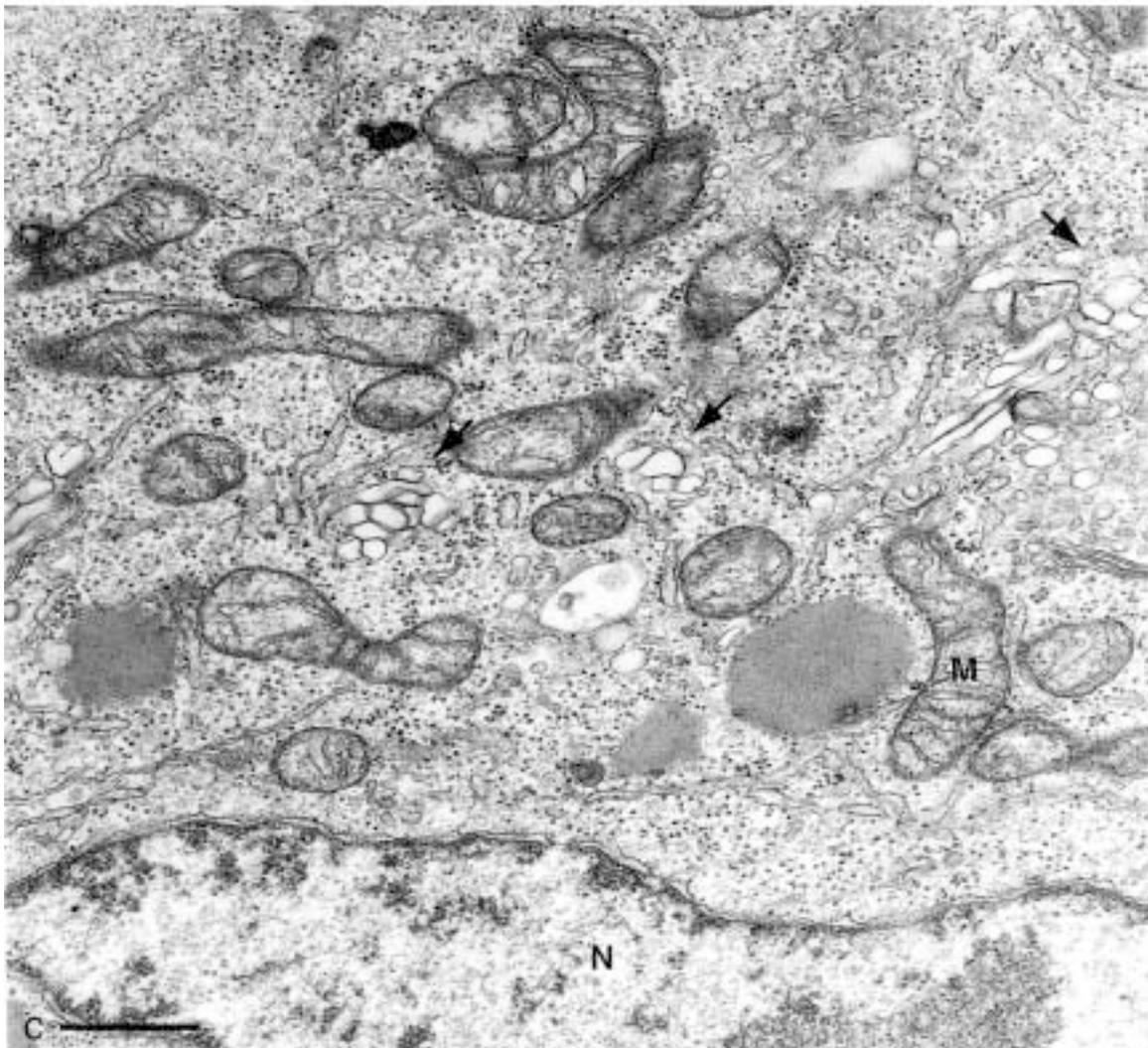
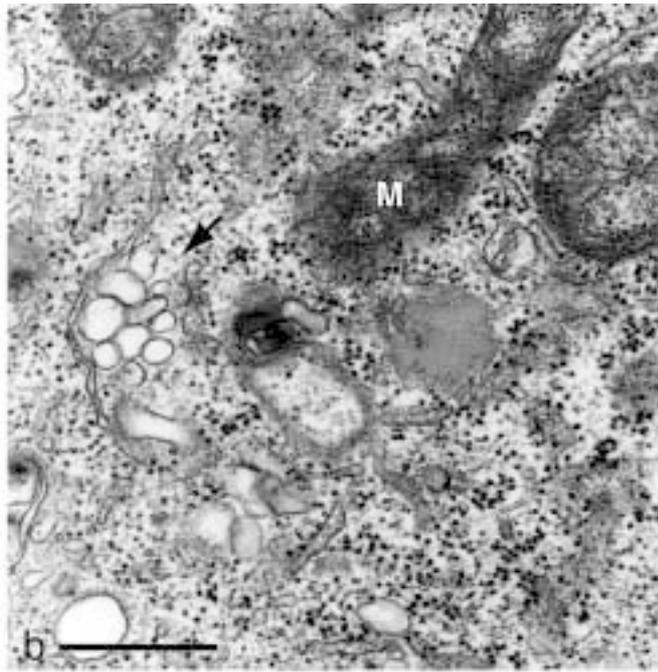
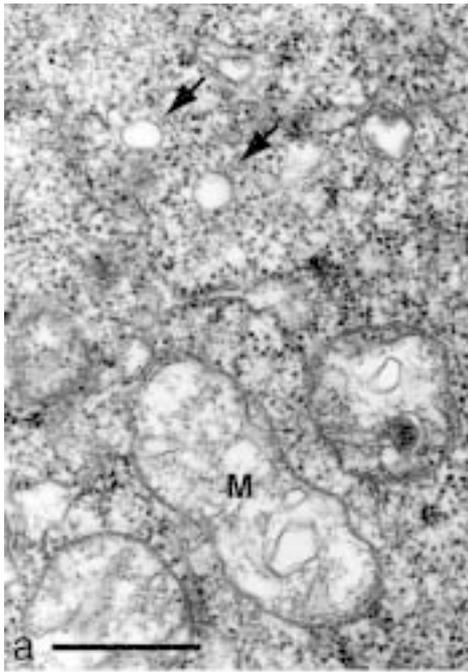


Abb. 17

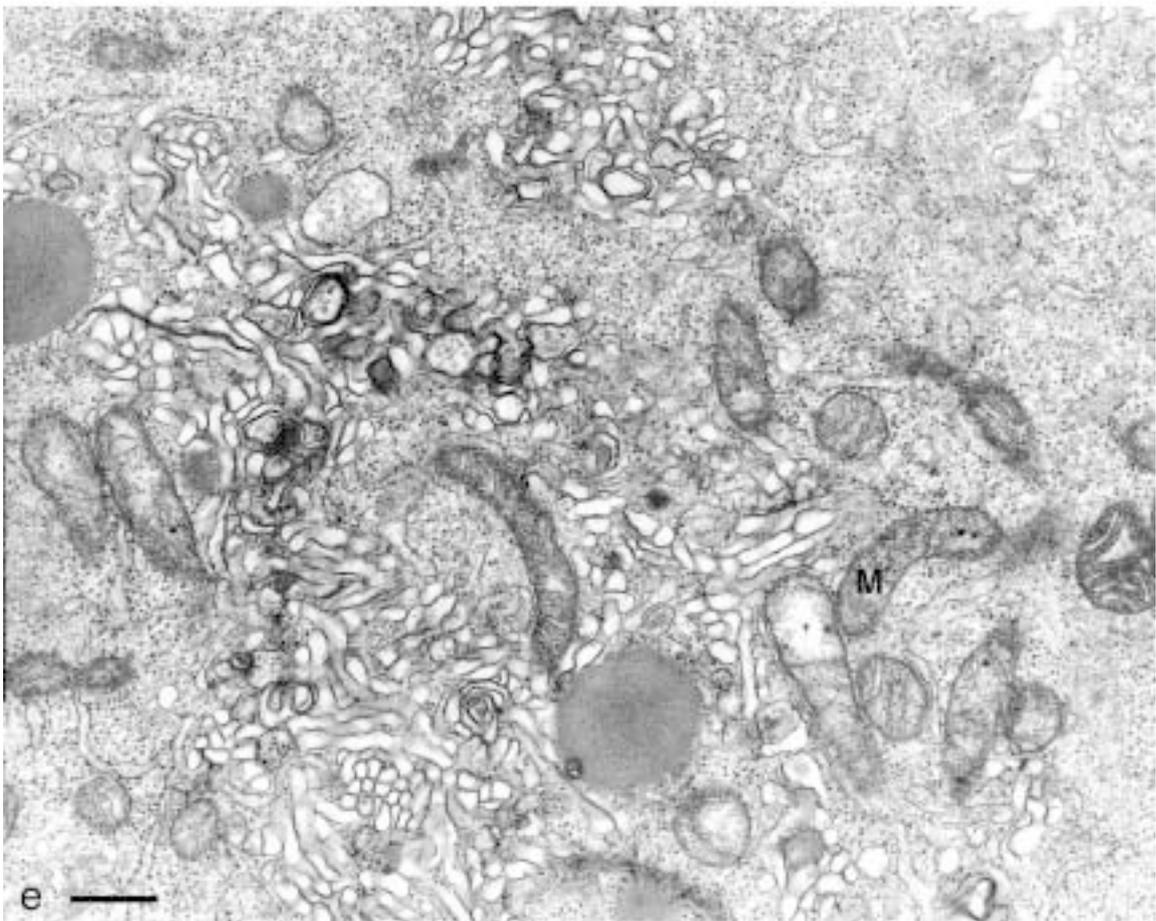
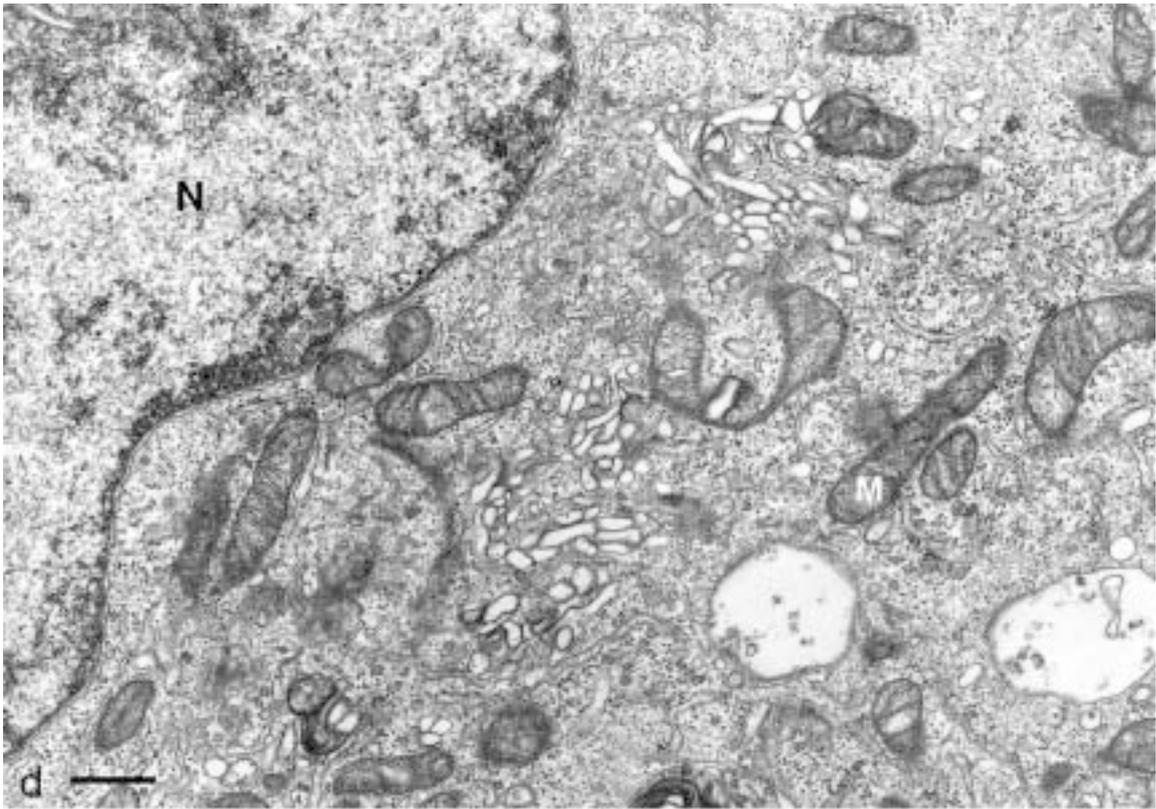


Abb. 17

Untersuchung des Verlaufs der Poliovirus-Infektion durch Immunfluoreszenz-Analysen

Zur Untersuchung des Zeitverlaufs der Poliovirus-Infektion mittels Immunfluoreszenzanalysen wurde ein monoklonaler Antikörper gegen das Poliovirus Protein 2B verwendet. Antikörper gegen 2B detektieren auch dessen Vorläufer, das Protein 2BC. Es wurde schon in früheren Studien gezeigt, daß die Proteine 2BC und 2B ausschließlich mit den Membranen der Poliovirusvesikel assoziiert sind (Bienz et al., 1994; Egger et al., 1996), daher konnten diese als Marker für die Poliovirus-Vesikel definiert werden. Als Fluoreszenzkonjugate wurden verschiedene Produkte getestet. Der Goat anti Mouse-Antikörper (GAM), an den das Fluorochrom Cy3 gekoppelt war, erwies sich als ein gut geeigneter sekundärer Antikörper, da er neben einer geringen Hintergrundfluoreszenz ein starkes spezifisches Signal zeigte. Dabei war das Ausbleichen dieses Fluorochroms („Fading“) bei der Verwendung des Anti-Fading-Reagenz NPG im Eindeckmedium, nur schwach ausgeprägt. Das Verhältnis von Signal zu Hintergrund bei dem Cy3-Konjugat war unter den verwendeten Bedingungen besser, als bei allen anderen in der vorliegenden Arbeit getesteten Kombinationen von Fluorochromen und Eindeckmedien. Diese Eigenschaften machten das erwähnte Cy-3 Konjugat, zu einem geeigneten Kandidaten für die Untersuchung der frühen Stadien der Poliovirus-Replikation, da es die Detektionsgrenze für 2B herabsetzte.

Die Untersuchung des Zeitverlaufs der Poliovirus-Infektion diente der Bestimmung des frühesten Zeitpunkts der immunocytochemischen Detektion des Proteins 2B, wobei durch den Vergleich mit den Daten der Elektronenmikroskopie die Bildungsorte der Poliovirus-Vesikel dargestellt werden konnten.

Abbildung 18 zeigt den Zeitverlauf der Immunfluoreszenz-Detektion des 2B-Signals in BT7-H Zellen zu verschiedenen, mit den Untersuchungen im Elektronenmikroskop korrelierenden Zeitpunkten nach der Poliovirus-Infektion. Es ist eine sukzessive Zunahme des 2B-Signals über

Abb. 17: Verlauf der Poliovirus-Infektion in BT7-H Zellen im Elektronenmikroskop - Details. BT7-H Zellen wurden zu den Zeitpunkten 2.30, 3, 3.30, 4, 4.30 hpi nach der Infektion mit Poliovirus Sabin1 eingebettet. Früh in der Infektion sind einzelne Vesikel im Cytoplasma der Zelle zu erkennen, die jedoch nicht als Poliovirus-Vesikel identifiziert werden können, da sie durch die fehlenden Cluster keine Fusionsmembranen aufweisen (a, Pfeile; Maßstab: 0,5 µm). Später bilden sich die ersten Cluster der PV-Vesikel, die häufig in der Nähe der ER-Membranen zu finden sind (b, Maßstab: 0,5 µm). Die Anzahl der Vesikel-Cluster nimmt während der Infektion immer mehr zu (c, Maßstab: 0,5 µm) und die Anzahl der Vesikel pro Cluster ebenfalls (d, Maßstab 0,5 µm), sodaß die einzelnen Cluster sich spät in der Infektion zu einem großen Vesikelfeld im Cytoplasma der infizierten Zellen zusammenlagern (e, Maßstab 0,5 µm). Besonders zu den späteren Zeiten der Infektion ist deutlich die teils tubuläre Morphologie der PV-Vesikel zu erkennen (c, d, e). N = Nukleus, M = Mitochondrien, Pfeile: Vesikel-Cluster.

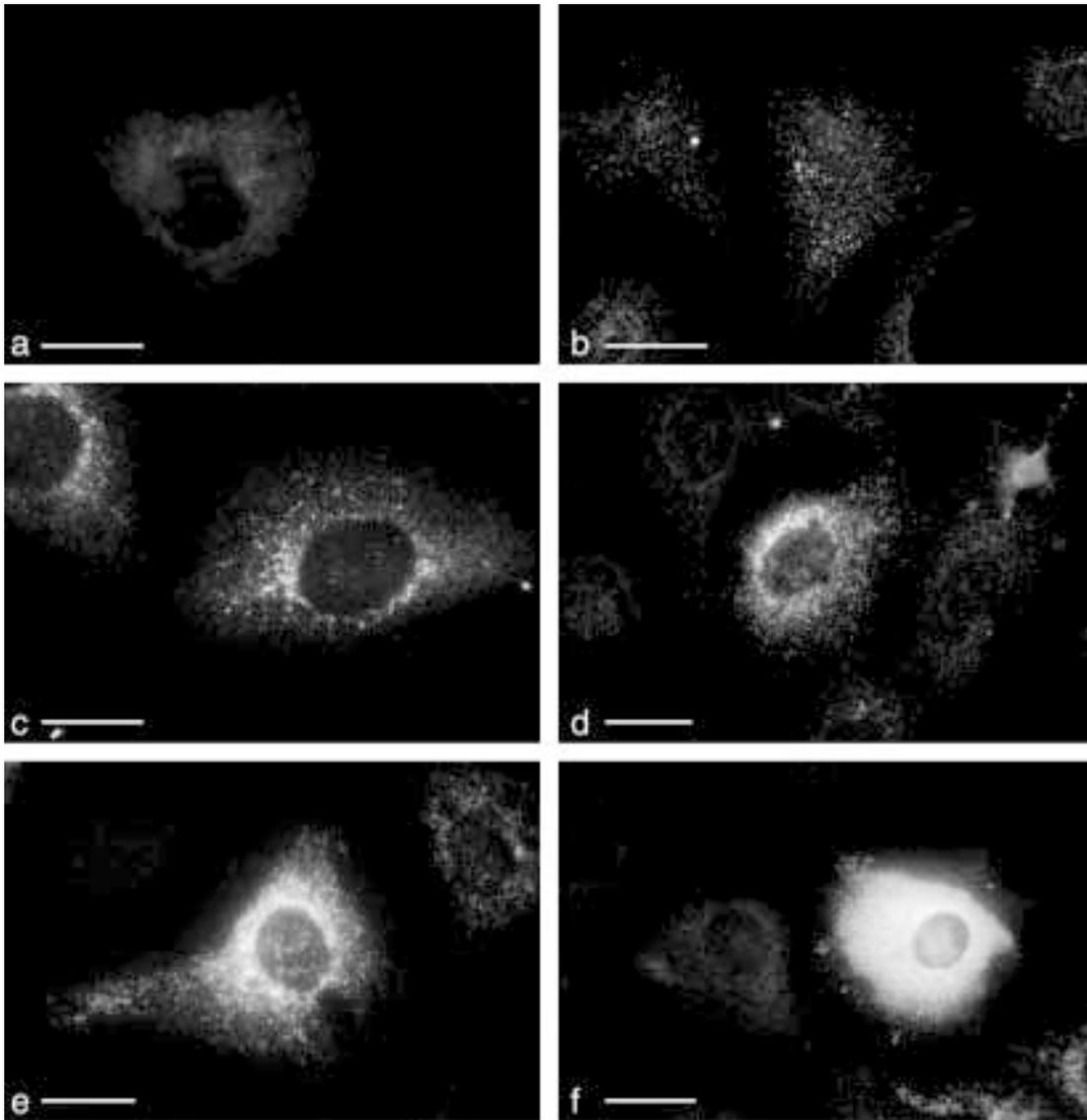


Abb. 18: Verlauf der Poliovirus-Infektion in BT7-H Zellen in der Immunfluoreszenz mit dem Marker für die Poliovirus-Vesikel. BT7-H Zellen wurden zu den Zeitpunkten 3, 3.30, 4, 4.30 und 5 hpi fixiert und das PV-Protein 2B, der Marker für die PV-Vesikel, mit einem entsprechenden Antikörper und einem Cy3-Konjugat markiert. In den frühen Phasen der Infektion fehlt ein spezifisches Signal des 2B-Markers weitgehend (a, 3 hpi). Das erste deutliche Signal des 2B-Markers konnte 3.30 hpi detektiert werden und trat in einem punktförmiges Muster verteilt im Cytoplasma der infizierten Zellen auf (b), das typisch für die ersten Poliovirus-Vesikel ist. Im Verlauf der Infektion nahm das 2B- Signal weiter zu und trat vor allem in den Bereichen um den Zellkern auf (c, 4 hpi; d, 4.30 hpi; e, 5 hpi), zum gleichen Zeitpunkt wie in anderen Zellen der Kultur das gesamte Cytoplasma ein starkes 2B-Signal auf (f, 5 hpi). Maßstäbe: 20 μm (a bis f).

den Zeitraum der Infektion zu erkennen. Doch nicht nur die Menge des 2B-Signals nimmt in der Infektion zu, auch die Verteilung des Signals verändert sich deutlich von den frühen zu den späten Stadien der Infektion. Zu früheren Zeiten der Infektion (3 hpi) konnte in den meisten Zellen lediglich die Hintergrundfluoreszenz der Antikörper detektiert werden (Abb. 18a). Bei einigen wenigen Zellen allerdings gab es Bereiche, die stärker als das Hintergrundsignal fluoreszierten. Dieses Signal war jedoch so schwach, daß zu diesem Zeitpunkt keine eindeutige Unterscheidung zwischen Signal und Hintergrund möglich war. Außerdem war die Fluoreszenz diffus im Cytoplasma - meist in der Nähe des Zellkerns - verteilt und hatte wenig Ähnlichkeit mit dem später detektierten punktförmigen Muster der Markierung der Poliovirus-Vesikel. Das erste deutliche 2B-Signal, das aufgrund der punktförmigen Lokalisierung im Cytoplasma eindeutig den Poliovirus-Vesikeln zugeordnet werden konnte, wurde zum Zeitpunkt 3.30 hpi detektiert (Abb. 18b). Dieses Signal bestand aus kleinen Punkten, deren Größe variierte und die nicht immer rund waren, sondern teilweise leicht tubulär erschienen. Zum Zeitpunkt 4 hpi konnte bereits ein deutlich stärkeres 2B-Signal in den infizierten Zellen detektiert werden. Dieses Signal zeigte eine deutliche Akkumulation in den perinukleären Bereichen des Cytoplasma meist an einer Seite der Zelle (Abb. 18c), während die andere Seite der gleichen Zelle meist noch ein lockeres punktförmiges Signal des 2B-Markers aufwies. In Abbildung 18d ist eine Zelle zum Zeitpunkt 4.30 hpi abgebildet. Hier ist deutlich zu erkennen, daß die Stärke und die Menge der Fluoreszenz zugenommen hat. Das 2B-Signal ist weiterhin in Cytoplasma um den gesamten Nukleus angereichert, wobei in der Peripherie der Zellen weiterhin das lockere gepunktete 2B-Signal vorkommt. Die Menge der Fluoreszenz hat im Vergleich zu den früheren Zeitpunkten wiederum zugenommen und es fällt in diesem Bild eine deutlich grobe Textur der 2B-Fluoreszenz in der Nähe des Nukleus auf, die in den späteren Phasen der Infektion häufig beobachtet wurde. In den Abbildungen 18e und f sind zwei BT7-H Zellen 5 h nach der Infektion mit Poliovirus Sabin1 dargestellt. Bei beiden ist eine Zunahme der Fluoreszenz der 2B-Markierung zu sehen, die in Abb. 18f besonders stark ist. Während in Abb. 18e noch einzelne Strukturen mit 2B-Signal in der Peripherie der Zelle zu unterscheiden sind, befindet sich in der Zelle in Abb. 18f bereits so viel 2B-Protein, daß es zu diesem Zeitpunkt nicht mehr möglich ist, zwischen einzelnen markierten Strukturen im Cytoplasma zu unterscheiden. Die Zelle in Abb. 18f zeigt bereits erste Anzeichen eines CPE, da sich der Zellkörper leicht abrundet und die Zelle ihre fibroblastische Form weitgehend verliert. Da die beiden letzten Bilder Zellen zeigen, die zum gleichen Zeitpunkt nach der Infektion in der gleichen Kultur vorkamen, verdeutlichen diese, daß es zu den gleichen Zeitpunkten der Infektion teils deutliche Unterschiede der Menge des detektierten 2B-Proteins gab. Dies hing mit der Asynchronität der Infektion in der verwendeten Zellkultur zusammen und ermöglichte daher einen Spielraum bei der Auswahl der untersuchten Zellen besonders im Hinblick auf die Tatsache, daß die frühen Phasen der Infektion in dieser Arbeit untersucht werden sollten, also die Zeitpunkte, zu denen frühest möglich das 2B-Protein assoziiert mit der Bildung der Poliovirus-Vesikel detektiert werden konnte. Für die

Abbildung 18 wurden jeweils für die Zeitpunkte der Infektion repräsentative, also der Mehrheit der Zellen in der Kultur zu diesem Zeitpunkt der Infektion entsprechende, Zellen ausgewählt. Anhand dieses Zeitverlaufs der Infektion in der Immunfluoreszenzanalyse wurde der Zeitpunkt 3.30 hpi als optimal für die Untersuchung der Poliovirus-Vesikel ausgewählt, da zu diesem Zeitpunkt das frühest mögliche deutliche 2B-Signal als punktförmiges Muster dargestellt werden konnte, daß mit den Membranen der PV-Vesikel assoziiert war.

Kinetik der Proteinsynthese von Poliovirus Sabin1 in BT7-H Zellen

Die Bestimmung der Kinetik der Proteinsynthese Poliovirus-infizierter Zellen ist eine geeignete Methode um den Verlauf der Infektion biochemisch zu charakterisieren. Nachdem die wenigen genomischen RNAs des Virus zu Beginn der Infektion vom zellulären Proteinsynthese-Apparat translatiert werden und die ersten Poliovirus-Vesikel im Cytoplasma der Zelle akkumulieren, werden durch die beginnende Replikation eine Vielzahl neuer viraler RNA-Genome erstellt, die wiederum der viralen Translation zur Verfügung stehen. Mit der Synthese der viralen Proteine geht die Spaltung des eukaryotischen Initiationsfaktors eIF-4G durch die virale Protease 2A einher, weshalb die zelluläre Proteinsynthese im Verlauf der Infektion blockiert wird (siehe Kapitel 1.3. „Translation“). Diese Prozesse führen zu einer kontinuierlichen Zunahme der viralen Translationsrate, die erst in den späten Phasen der Infektion wieder abnimmt, da die Menge der translationskompetenten Membranen während der viralen Replikation reduziert wird (siehe Diskussion). Der Verlauf der Translationsrate der Poliovirus-Proteine folgt daher einer charakteristischen Kurve mit einem

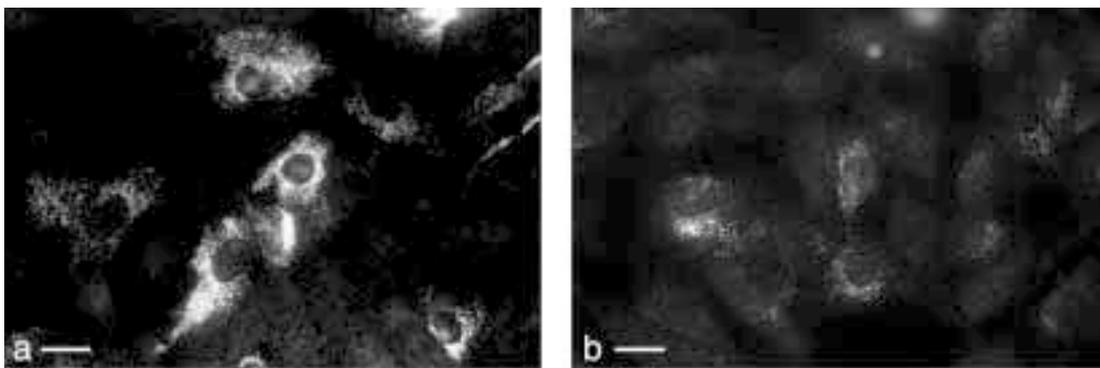


Abb. 19: Inhibition der Translation von Poliovirus Sabin1 durch erhöhte NaCl-Konzentration. Poliovirus-infizierte BT7-H Zellen wurden in normalem DMEM (a) oder in DMEM mit 120 mM NaCl zusätzlich (b) inkubiert und nach 3.30 hpi fixiert und mit dem Antikörper gegen PV-2B und dem Konjugat Cy3 markiert. Wurden die Zellen während der Infektion mit zusätzlich 120 mM NaCl inkubiert, war die Rate der Proteinsynthese deutlich geringer und daher das Signal des 2B-Markers bedeutend schwächer (b), als in nicht mit der höheren NaCl-Konzentration behandelten infizierten Zellen zum gleichen Zeitpunkt (a). Maßstäbe: 20 μ m (a und b).

Maximum und der anschließenden Abnahme der pro Zeiteinheit synthetisierten Proteine. Die Messung der Kinetik der Proteinsynthese erfolgte durch die Bestimmung der Radioaktivität von Zellsaten mittels Flüssigszintillation. Damit wurden Proteine detektiert, die während der Infektion synthetisiert wurden und durch den Einbau von radioaktivem ^3H -Leucin markiert wurden. Um die Kinetik der viralen Proteinsynthese durch die zelluläre Proteinsynthese, die zu Beginn der Infektion noch nicht inhibiert war, nicht zu überlagern, wurde zu Beginn der Messung dem Medium zusätzlich 120 mM NaCl zugegeben. Nuss et al. konnten zuvor zeigen, daß die NaCl-Konzentration von insgesamt 230 mM (DMEM enthält 110 mM NaCl) zur Blockierung der zellulären Proteinsynthese führte, jedoch die Translation der viralen RNA nicht unterbinden konnte (Nuss et al., 1975). Bei den ersten Messungen der Kinetik der viralen Proteinsynthese konnte jedoch nach der Erhöhung der NaCl-Konzentration der erwartete charakteristische Verlauf der Kinetik nicht gezeigt werden. Um zu überprüfen, ob die Infektion der Zellkulturen unter den verwendeten Bedingungen erfolgreich war, wurde eine immunocytochemische Detektion des viralen 2B-Proteins nach der Infektion mit Poliovirus Sabin1 in Zellkulturen durchgeführt, die entweder mit 120 mM NaCl, oder ohne zusätzliches NaCl inkubiert wurden. Dabei stellte sich heraus, daß im Gegensatz zu den vorherigen Ergebnissen mit PV Mahoney1 (Nuss et al., 1975), die Translation des PV Sabin1 - wie die der zellulären mRNAs - durch die Zugabe von 120 mM NaCl inhibiert wurde. Abbildung 19a zeigt die 2B-Markierung einer nicht mit zusätzlichem NaCl behandelten, mit PV-Sabin1 infizierten Zellkultur 3.30 hpi. Im Gegensatz zu den deutlichen 2B-Signalen in dieser Kultur zeigte die mit zusätzlich 120 mM NaCl inkubierte Zellkultur zur gleichen Zeit nach der Infektion ein bedeutend schwächeres Signal der 2B-Immunkolorierung (Abb. 19b). In der Zellkultur wurden also unter der Inkubation mit 120 mM zusätzlichem NaCl also bedeutend weniger virale Proteine synthetisiert, als ohne die Zugabe des NaCl.

Aufgrund der beobachteten Inhibition der Translation von PV Sabin1 durch die Zugabe von 120 mM NaCl wurde auf die Blockierung der zellulären Translation zu Beginn der Infektion mit dieser Methode verzichtet und die Kinetik der totalen Proteinsynthese der Zellen nach der Infektion mit Poliovirus untersucht. Da das Maximum der viralen Proteinsynthese erst nach der Inhibition der zellulären Proteinsynthese erreicht wird, konnte dieses Maximum der viralen Proteinsynthese durch die Analyse der gesamten Proteinsynthese der infizierten Kulturen dargestellt werden. In Abbildung 20 ist die Kinetik der Proteinsynthese einer mit Poliovirus Sabin1 infizierten BT7-H Zellkultur gezeigt. Da die Inhibition der zellulären Translation im Verlauf der Infektion - wie erwartet - vor dem Maximum der viralen Translationsrate eintrat, lag die virale Translationsrate ab dem Zeitpunkt 4 hpi über der verbliebenen zellulären Translationsrate. Das Maximum der viralen Proteinsynthese lag für PV Sabin1 in BT7-H Zellen bei 4.30 h nach der Infektion vor, was in mehreren Versuchen reproduziert werden konnte. Das Maximum der viralen Proteinsynthese in Hep-2 Suspensionskulturen liegt bei 2.30 hpi (Bienz et al., 1980), die Infektion von PV Sabin1 in BT7-H Monolayer-Kulturen war also gegenüber

dem Infektionsverlauf der zuvor für die Charakterisierung der Poliovirus-Infektion verwendeten Hep-2 Suspensionskulturen um ca. 2 h verzögert. Dies bestätigte die Ergebnisse der Verlaufs der Infektion durch die Detektion des Proteins 2B in der Immunfluoreszenz.

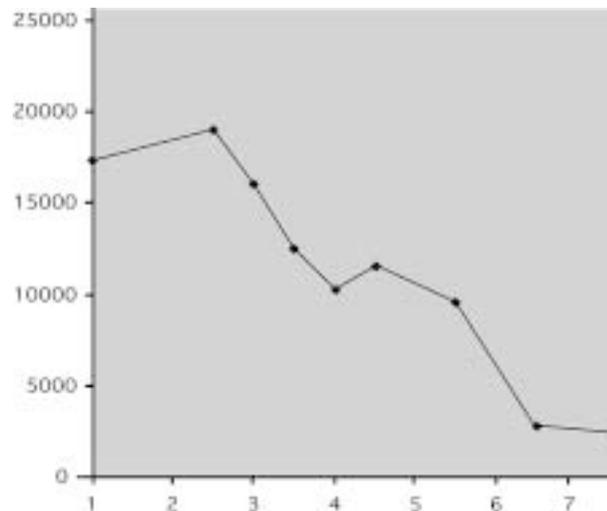


Abb. 20: Kinetik der Proteinsynthese von Poliovirus Sabin1-infizierten BT7-H Zellen. Flüssigszintillationsmessung der Rate des Einbaus von ^3H -Leucin in neu synthetisierte Proteine in BT7-H Zellen nach der PV-Infektion. Die Zellkultur wurde mit $1 \mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Leucin für jeweils 10 min pro Zeitpunkt inkubiert. Die abgebildeten Werte sind Mittelwerte aus zwei zum gleichen Zeitpunkt genommenen Proben. Die zelluläre Proteinsynthese nimmt ab 2.30 hpi ab, während die virale Proteinsynthese ihr Maximum bei 4.30 hpi bzw. 5 hpi erreicht und danach erneut abnimmt.

3.4. Vergleich der Morphologie der Poliovirus-Vesikel verschiedener Wirtszellen und Poliovirus-Stämme im Elektronenmikroskop

In den elektronenoptischen Untersuchungen des Verlaufs der Poliovirus-Infektion in BT7-H Zellen wurden PV-Vesikel mit tubulärer Morphologie detektiert, die bisher für die Poliovirus-Infektion nicht beschrieben worden war (Abb. 16 und 17). Da die Infektion mit dem Poliovirus-Stamm Sabin1 vor dieser Arbeit noch nicht näher untersucht worden war, stellte sich die Frage, ob die abweichende Morphologie der Vesikel virusspezifisch oder zellspezifisch ist. Um diese Frage zu beantworten, wurden BT7-H Zellen und HeLa Zellen jeweils mit den Poliovirus-Stämmen Sabin1 oder Mahoney1 infiziert und die infizierten Zellen in Epon eingebettet. Nachdem Dünnschnitte von den Einbettungen angefertigt worden waren, wurden diese im Elektronenmikroskop untersucht. Abbildung 21a zeigt eine BT7-H Zelle infiziert mit Poliovirus Mahoney1, 3.30 h nach der Infektion. Die Vesikel wiesen - wie auch bei der Infektion mit Sabin1 (Abb. 16 und 17) - neben der früher beschriebenen runden Form auch die hier beschriebene tubuläre Morphologie auf. Dies deutet darauf hin, daß der Typ der Wirtszelle die Ursache für die Entstehung der abweichenden

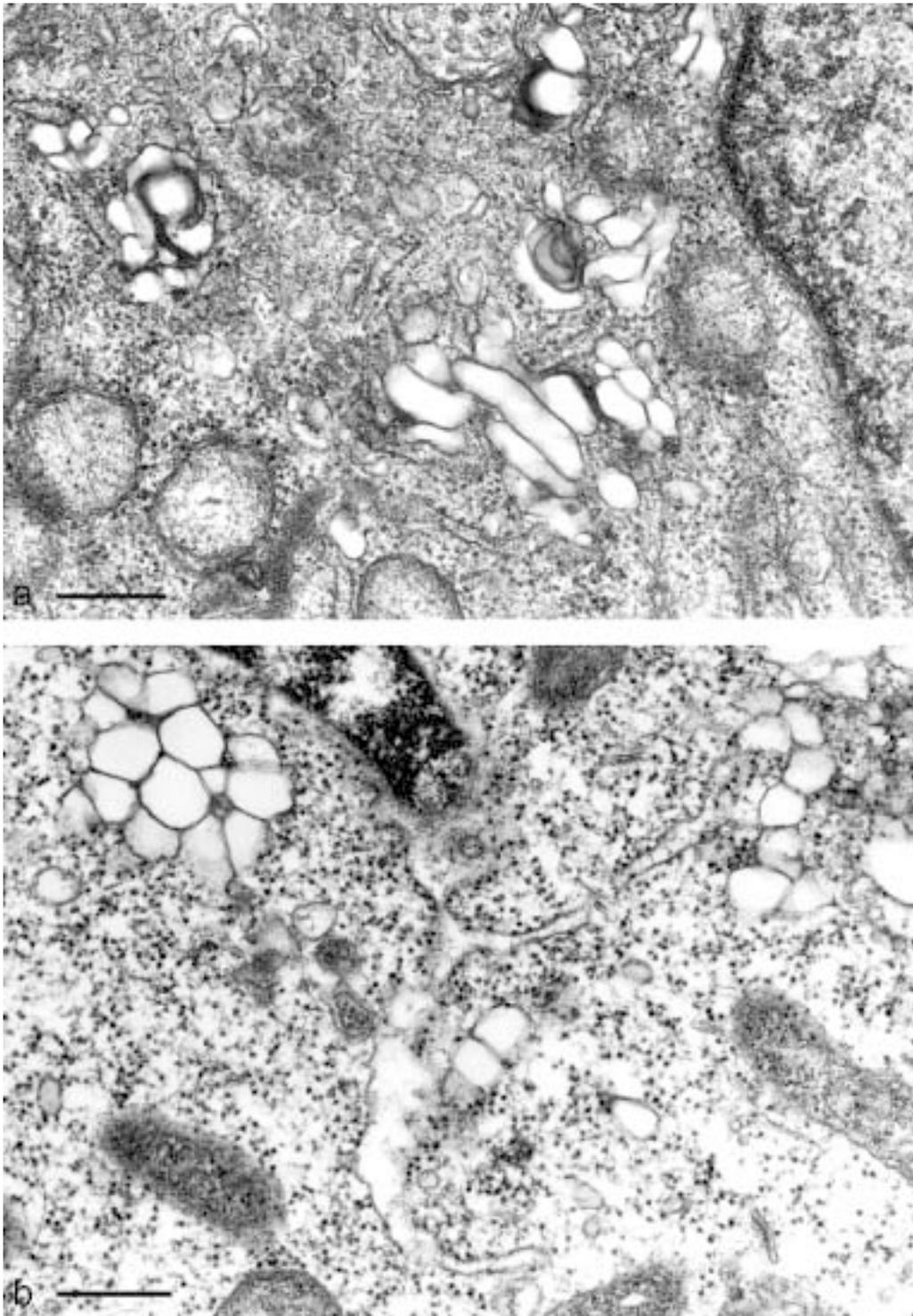


Abb. 21: Die Morphologie der Poliovirus-Vesikel ist abhängig von der Wirtszelle. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen BT7-H Zellen infiziert mit Poliovirus Mahoney1, 3.30 hpi (a) und HeLa Zellen infiziert mit PV Sabin1, 3.30 hpi (b). Die Morphologie der Poliovirus-Vesikel ist in BT7-H Zellen tubulär, während die PV-Vesikel in den HeLa-Zellen (infiziert mit PV Sabin1) durchweg rund ist. Beide Vesikelpopulationen sind an den Fusionsmembranen eindeutig als Poliovirus-Vesikel zu identifizieren. Maßstäbe 400 nm (a und b).

Morphologie der tubulären PV-Vesikel ist. Als Kontrolle wurden mit PV Sabin1 infizierte HeLa Zellen untersucht. Abbildung 21b zeigt HeLa Zellen 3.30 h nach der Infektion mit PV Sabin1. Die viralen Vesikel zeigten ausschließlich runde Morphologie Gegensatz zu den tubulären Vesikeln, die in den BT7-H Zellen gefunden wurden. Dagegen wurden in HeLa Zellen ausschließlich runde Poliovirus-Vesikel gefunden, auch wenn diese mit PV Mahoney1 infiziert worden waren (nicht gezeigt). Die vorliegenden Ergebnisse zeigten, daß die beobachtete tubuläre Morphologie der Poliovirus-Vesikel nicht durch den infizierenden Virusstamm hervorgerufen wurde, jedoch in den verschiedenen Zelltypen variierte.

Durch die Experimente im Elektronenmikroskop, Lichtmikroskop und durch die Untersuchung der Kinetik der Proteinsynthese von Poliovirus Sabin1 in BT7-H Zellen konnte geklärt werden, daß die Infektion mit der Bildung der Poliovirus-Vesikel in diesem System entsprechend der anderen bereits beschriebenen experimentellen Systemen verlief (Bienz et al., 1987; Egger et al., 2001). Der Unterschied zu den bisher beschriebenen Zellen bzw. Virusstämmen war zum Einen die etwas abweichende Form der Poliovirus-Vesikel, die spezifisch für die verwendeten Zellen war. Die Replikation des Virus in den BT7-H Zellen war im Gegensatz zu den etablierten HeLa-Zellen leicht verzögert, was durch den Verlauf der Syntheserate der viralen Proteine bzw. den ersten Zeitpunkten der Detektion der 2B-Proteine in der Immunfluoreszenz demonstriert werden konnte. Diese leichte Verzögerung der viralen Replikation war jedoch für die in dieser Arbeit vorgenommenen Untersuchungen der frühen Phasen des Aufbaus des viralen Replikationskomplex hilfreich, da sie eine Analyse der frühen Zeitpunkte der Bildung der Poliovirus-Vesikel ermöglichte. Nach den beschriebenen Ergebnissen wurden die Versuche zur Bestimmung der Ursprungs der Poliovirus-Vesikel und des Mechanismus ihrer Entstehung zum Zeitpunkt 3.30 h nach der Infektion durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt bereits kleine Vesikel-Cluster aber auch einzelne Vesikel im Elektronenmikroskop gefunden wurden, die virale Translation vor ihrem Maximum war und eine Detektion der Poliovirus-Vesikel in der Immunfluoreszenz erstmals möglich war.

3.5. Auswahl der zellulären Marker für die Untersuchung von Kolokalisation in der Immunfluoreszenz

Für die Untersuchung des Ursprungs der Poliovirus-Vesikel durch die Bestimmung der Kolokalisation des viralen Vesikelmarkers 2B mit verschiedenen zellulären Markern, wurden hauptsächlich Marker für das endoplasmatische Retikulum (ER) und für den Golgi-Apparat eingesetzt. Um verlässliche Informationen über den Bildungsort der Vesikel zu erhalten, mußten die verwendeten Marker genau definiert sein und deren Verwendbarkeit in den geplanten Versuchen überprüft werden. Im Verlauf dieser Arbeit standen die im Teil „Material und Methoden“ beschriebenen Antikörper gegen Markerproteine der verschiedenen Organellen zur

Verfügung. Im Folgenden werden aufgrund ihrer zentralen Bedeutung für diese Arbeit besonders die Kriterien zur Auswahl der ER- und Golgi-Marker genauer beschrieben.

Auswahl der Marker für das endoplasmatische Retikulum.

In der Literatur findet sich eine Vielzahl an Informationen über ausschließlich im ER lokalisierter Proteine, verschiedener Funktionen. Für die Untersuchung der Herkunft der PV-Vesikel waren besonders die Membranproteine des ER von Interesse, da es zu Beginn des Projektes wahrscheinlich erschien, daß Membranproteine des Donororganells bei der Entstehung der PV-Vesikel in deren Membranen übernommen werden. Intrazelluläre Membranen werden hauptsächlich durch die Zusammensetzung der enthaltenen Transmembranproteine charakterisiert, weshalb eine Zuordnung der Membranen zu verschiedenen zellulären Kompartimenten über die Lokalisierung von Membranproteinen möglich ist. Aus diesem Grund wurden die Antikörper gegen die luminalen ER-Marker Grp78 (=BIP) und Calreticulin (beides molekulare Chaperone) nach der Anfangsphase dieser Arbeit nicht mehr verwendet.

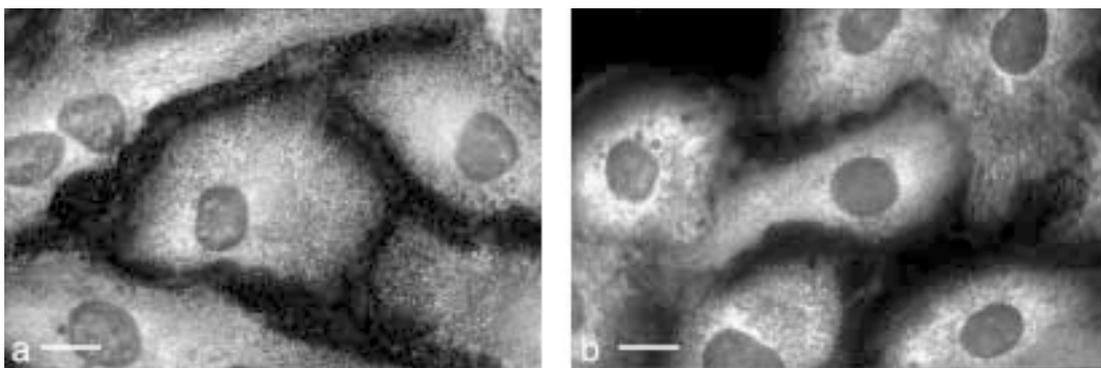


Abb. 22: Die ER-Marker p63 und MERG in der Immunfluoreszenz. Uninfizierte BT7H Zellen wurden fixiert und mit Antikörpern gegen p63 (a) und MERG (b) sowie dem Konjugat Cy2 inkubiert. Die deutliche netzartige Textur des ER konnte mit beiden Markern gut nachgewiesen werden. Die größere Dicke der Zelle in der perinukleären Region führt zum stärkeren Signal beider Marker in diesen Bereichen. Maßstäbe: 20 μm (a und b).

Das entscheidende Kriterium bei den Membranmarkern des ER war eine möglichst ubiquitäre Lokalisierung des detektierten Proteins in den ER-Membranen. Ein Membranprotein, das nur in bestimmten Bereichen der ER-Membranen lokalisiert ist, wie z.B. das Protein Sec61, das eine Funktion bei der Translokation neu synthetisierter Polypeptide durch die ER-Membranen hindurch hat, würde nichts über die Herkunft eventuell an anderen Teilen der ER-Membranen gebildeter Vesikel aussagen. Für einige der vorhandenen Marker war eine Verteilung in den ER-Membranen nicht oder nur unzureichend beschrieben, diese wurden daher neben den besser beschriebenen

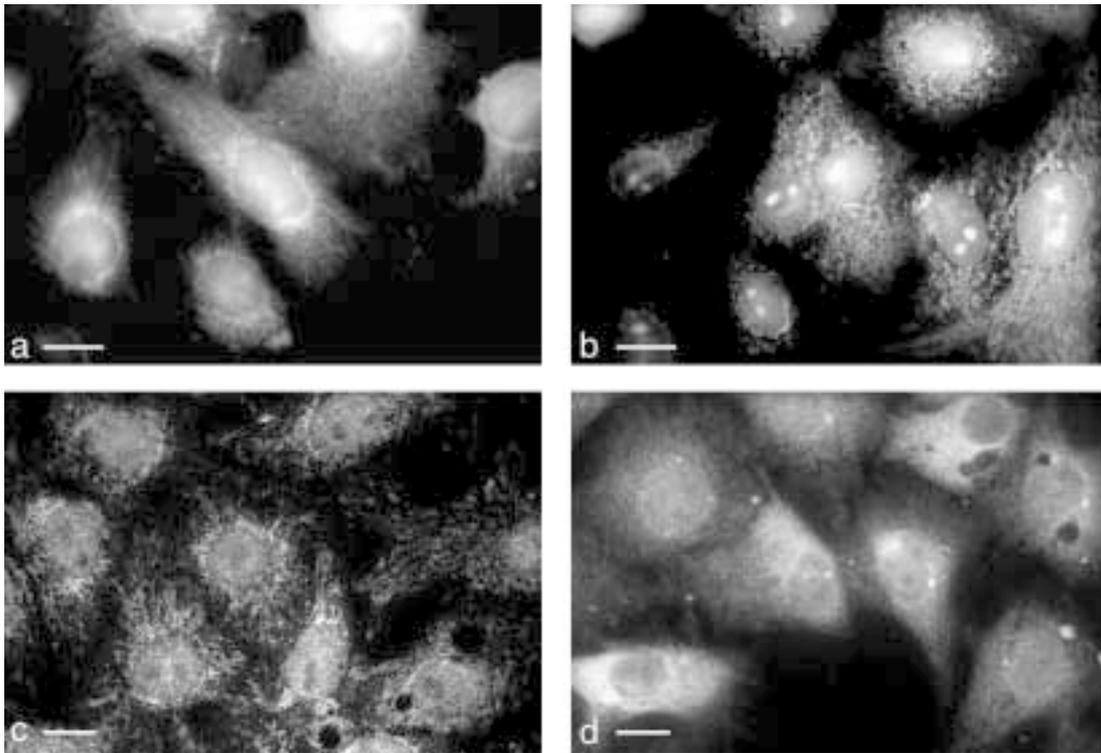


Abb. 23: Weitere ER-Marker in der Immunfluoreszenz. Uninfizierte BT7-H Zellen wurden fixiert und mit dem Farbstoff DiOC6 (a und b) sowie den Antikörpern gegen Cytochrom-b5 (c) oder Calnexin (d) und dem Konjugat Cy2 (c und d) markiert. DiOC6 und anti Cytochrom-b5 markierten vor allem die Mitochondrien, wie die typischen langen tubulären Signale im Cytoplasma zeigen. Der Antikörper gegen Calnexin zeigte nur eine diffuse Markierung des Cytoplasma der markierten Zellen. Diese Marker waren daher nicht für die weitere Verwendung geeignet. Maßstäbe: 20 μm (a bis d).

Markern in der Immunfluoreszenz in BT7-H Zellen getestet. Die Antikörper anti MERG (D. Meyer) und anti p63 (H.-P. Hauri) eigneten sich aus den folgenden Gründen am besten für die Darstellung des ER der BT7-H Zellen. p63 ist ein in allen Bereichen des ER vorhandenes Membranprotein, das die Membranen des ER mit den Mikrotubuli des Cytoskeletts verbindet (Klopfenstein et al., 1998). Der anti p63-Antikörper, der ausschließlich gegen dieses Protein gerichtet ist, resultierte in der besten Darstellung der ER-Membranen unter allen getesteten Markern (Abb. 22a, vergleiche Abb. 23). Bei höheren Vergrößerungen konnten damit sogar in der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie einzelne Verzweigungen des ER-Netzwerks in den verwendeten BT7-H Zellen - besonders in der flachen Peripherie der Zellen - unterschieden werden. Diese deutliche Darstellung des ER resultierte aus dem hohen Signal zu Hintergrund Verhältnis dieses Antikörpers. Die Spezifität dieses ER-Markers wurde durch das Ergebnis bestätigt, daß die Kernmembran der Zellen, die in die Membranen des ER übergeht, nicht durch den verwendeten Antikörper markiert wurde. Der Antikörper gegen MERG („major ER glycoproteins“), resultierte

in einer ähnlich guten Darstellung der Membranen des ER. Der anti MERG-Antikörper zeigte ebenfalls keine Markierung der Membran des Nukleus und verursachte nur einen geringen Hintergrund (Abb. 22b). Der Vorteil des anti MERG-Antikörpers in der vorliegenden Arbeit war, daß er ein breites Spektrum von ER-Membranproteinen detektierte und daher sehr gut in Ergänzung zum Antikörper gegen den Marker p63 eingesetzt werden konnte. Damit konnte eine allgemeine Aussage im Bezug auf die Präsenz von ER-Membranproteinen in den untersuchten Strukturen gemacht werden.

Die weiteren getesteten ER-Marker ergaben keine ähnlich überzeugenden Ergebnisse in der Immunfluoreszenz: Der Carbocyanin-Farbstoff DiOC6, der in der Literatur als spezifisch für das ER beschrieben wurde (Terasaki et al., 1984; Terasaki und Reese, 1992; Terasaki, 1993), markierte neben dem ER auch die Mitochondrien, wie in der typischen tubulären Struktur des Signals in Abbildung 23a zu erkennen ist. Außerdem variierte die Markierung mit DiOC6 stark bei den einzelnen Versuchen und war daher schlecht reproduzierbar (Abb. 23b). Daher erschien dieser Marker als wenig geeignet für die Beantwortung der Fragestellung dieser Arbeit. Der Antikörper gegen Cytochrom-b5 (De Silvestris et al., 1995), der die ER-spezifische Isoform dieses Proteins detektieren sollte, markierte intrazelluläre Strukturen generell schwach, die Markierung des ER war dabei besonders schwach ausgeprägt. Dagegen wurden die Mitochondrien der Zelle deutlicher markiert, was zur Vermutung führte, daß dieser Antikörper auch die in den Mitochondrien exprimierte, zweite Isoform dieses Proteins detektierte (Abb. 23c). Ein zweiter, kommerzieller Antikörper zeigte im Wesentlichen die gleichen Ergebnisse, wie der erst Antikörper gegen Cytochrom-b5. Der ebenfalls kommerzielle „ER-Tracker“, der nach den Angaben des Herstellers vor und nach Fixierung spezifisch das ER markieren sollte, zeigte vor der Fixierung der Zellen für die Immunfluoreszenz eine gute Markierung des ER. Nach der Fixierung war jedoch keine Markierung des ER mehr möglich, obwohl verschiedene Fixierungsmethoden mit diesem Marker getestet wurden (nicht gezeigt). Der Antikörper gegen Calnexin, einem molekularen Chaperon des ER, zeigte nur eine diffuse Markierung des Cytoplasmas und außerdem einen hohen Hintergrund im Zellkern, wie in Abbildung 23d zu sehen ist. Die zuletzt genannten Antikörper bzw. Marker kamen aufgrund der unzureichenden Markierung des ER - im Gegensatz zu den anti p63 und anti MERG Antikörpern - nicht in weiteren Experimenten dieser Arbeit zum Einsatz.

Das Protein 2A des Pflanzenvirus GFLV als potentieller ER-Marker

Um einen Marker für die Membranen des ER zu erhalten, der kein zelleigenes Protein war, sondern extern in die Zelle gebracht werden konnte, wurde versucht, ein Protein eines Pflanzenvirus in den Zellen zu exprimieren, das in Pflanzenzellen ausschließlich an die Membranen des ER bindet (Gaire, 1999). Das 2A-Protein des GFLV (Grapewine Fan Leaf Virus), einem mit Poliovirus verwandten RNA-Virus, bindet nach dessen alleiniger Expression oder während der Infektion des

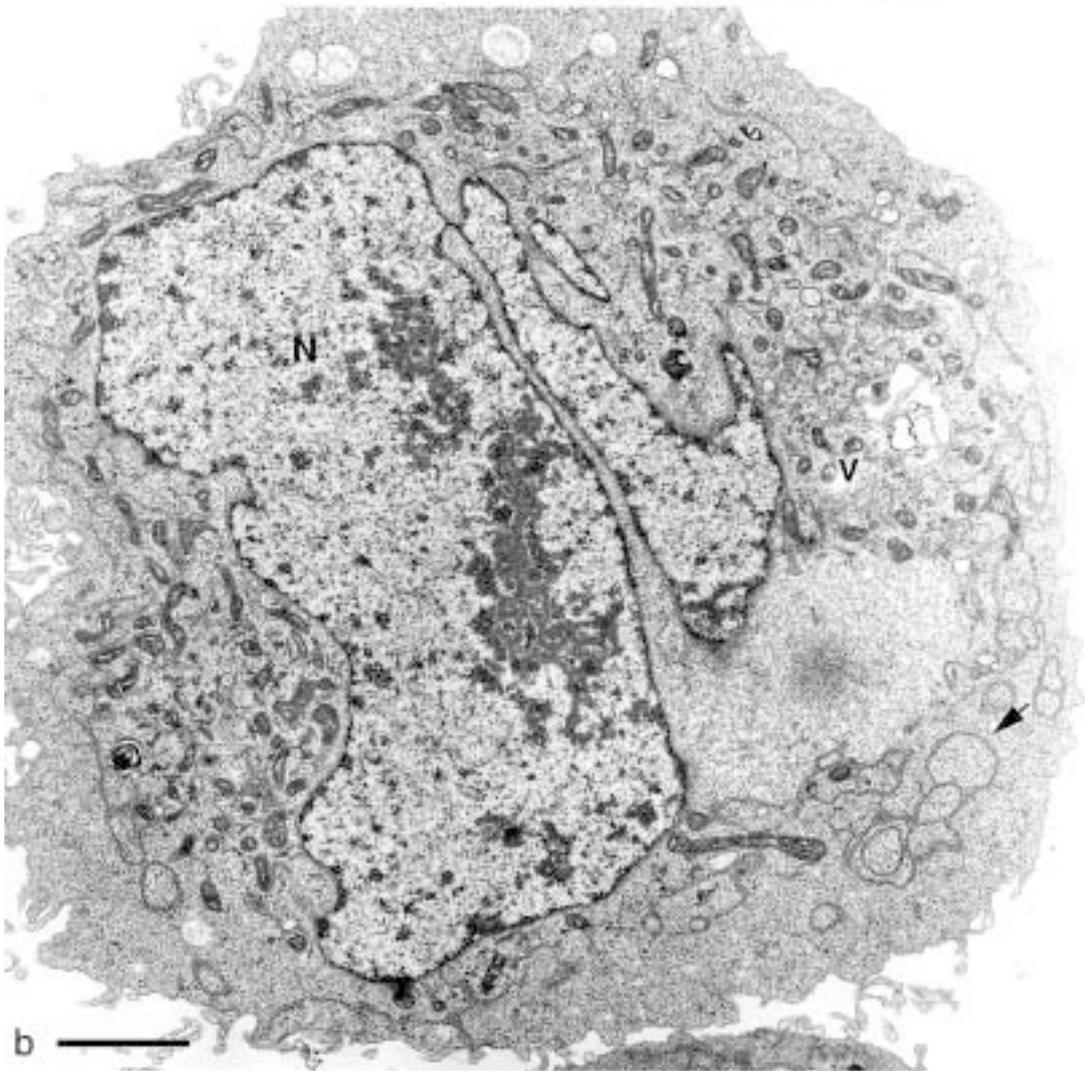
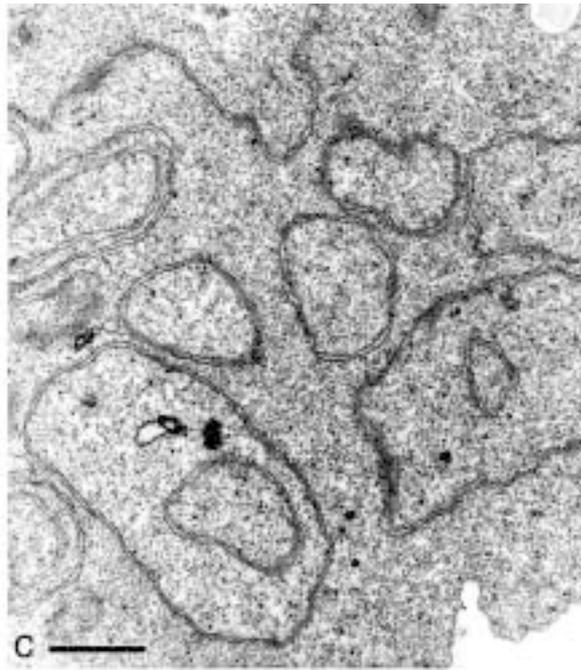
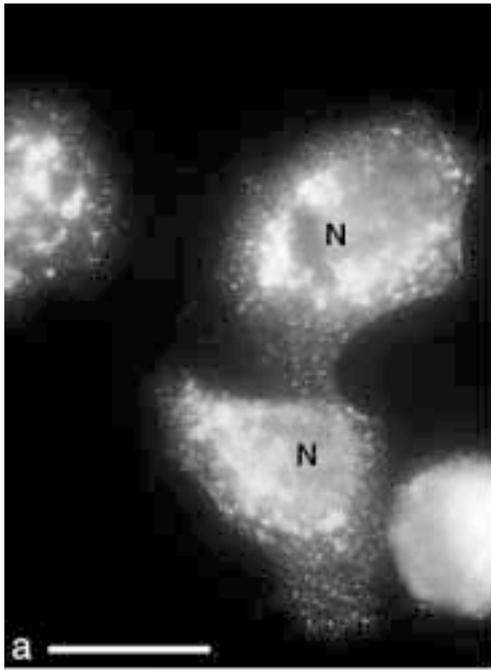


Abb. 24

Virus in Pflanzenzellen ausschließlich an die Membranen des ER. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Expression dieses Proteins in humanen HeLa-Zellen möglich ist und ob es ebenfalls ausschließlich an den Membranen des ER lokalisiert war. Zu diesem Zweck wurde ein Plasmid, das für ein 2A-GFP Fusionsprotein codierte (pTM-2A-GFP(GFLV)), mit Lipofectin in HeLa-Zellen transfiziert. Dies geschah zusammen mit der Infektion durch ein rekombinantes Vaccinia-Virus (VTF7-3, Fuerst et al., 1986), wodurch in den Zellen die T7-Polymerase exprimiert wurde. Dadurch konnte das 2A-GFP-Gen des Plasmids pTM-2A(GFLV), das unter der Kontrolle des T7-Promotors stand, in diesen Zellen exprimiert werden. GFP („green fluorescent protein“) ist ein aus der fluoreszierenden Qualle *Aequorea victoria* gewonnenes Protein, das bei ähnlichen Wellenlängen wie das Fluorochrom FITC fluoresziert und daher in einem Fluoreszenzmikroskop mit herkömmlichen FITC-Filtern detektiert werden kann.

Auswahl der Marker für den Golgi-Apparat

Wie auch bei den ER-Markern, wurden bei den Markern für den Golgi-Apparat ausschließlich Antikörper gegen Membranproteine verwendet um eine eindeutige Herkunftsangabe der untersuchten Membranen zu ermöglichen. Bei den Golgi-Markern spielt dieser Umstand eine besonders wichtige Rolle, da luminale Proteine bei der später in der Infektion beobachteten Desintegration des Golgi-Apparates ins Cytoplasma entlassen werden könnten und so zu falsch-positiver Kolokation mit dem Marker für die Poliovirus-Vesikel führen würden. In dieser Arbeit standen die folgenden Antikörper gegen Membranproteine des Golgi-Apparates zur Verfügung: anti Giantin, anti GP130 und anti GalT (siehe Kapitel „Material und Methoden“). Da an den Membranen des cis- und des mittleren Golgi die Vesikel des retrograden Transports gebildet werden und diese daher als möglicher Ursprung der Poliovirus-Vesikel vermutet wurden, war es wichtig für die Bestimmung der Herkunft der Poliovirus-Vesikel, daß die Golgi-Marker genau in ihrer Lokalisation im Golgi definiert waren. Der Marker GalT kommt in allen Bereichen des Golgi vor und ist daher nicht für eine der Subregionen des Golgi spezifisch (Watzel et al., 1991). Außerdem zeigte er in der Immunfluoreszenz eine schwache Markierung und eine deutliche Hintergrundfluoreszenz (nicht gezeigt). Daher wurde dieser Marker im weiteren Verlauf dieser

Abb. 24: Das 2A-Protein des GFLV ist als ER-Marker ungeeignet. HeLa Zellen wurden mit dem Plasmid pTM-2A-GFP transfiziert und für die Immunfluoreszenz (a) und die Elektronenmikroskopie (b und c) fixiert. Das Signal des 2A-GFP-Fusionsproteins wurde mit der Inkubation eines anti GFP-Antikörpers (konjugiert an das Fluorochrom Alexa488) verstärkt und zeigte eine punktförmige Verteilung im Cytoplasma der Zellen. Die Elektronenmikroskopie zeigte Veränderungen der ER-Membranen (b, Pfeil), die bei höherer Vergrößerung (c) als geschlossenes konzentrisches ER in Ringform identifiziert wurden. Maßstäbe: 20 µm (a), 2 µm (b), 1 µm (c), N = Nukleus, V = Vaccinia-Virus.

Arbeit nicht mehr verwendet. Weitere kommerziell erhältliche Marker für den Golgi-Apparat beruhen auf chemischen Färbungsmethoden, die zu unspezifisch für die Beantwortung der Fragestellung dieser Arbeit waren. Die beiden Proteine Giantin und GP130 sind ausschließlich in den Membranen des cis- und des mittleren Golgi-Apparates lokalisiert und haben Funktionen bei der Fusion zellulärer Transportvesikel mit den Membranen des Golgi (Seelig et al., 1994; Linstedt et al., 1995; Alvarez et al., 2000; Linstedt et al., 2000). Die Markierung beider Antikörper in der Immunfluoreszenz war ausgesprochen gut und die Hintergrundfluoreszenz war niedrig. Daher stellten die Antikörper gegen diese beiden Proteine für die vorliegende Arbeit ideale Marker zur Detektion der Golgi-Membranen dar. Abbildung 25 zeigt eine Aufnahme mit dem anti Giantin-Antikörper markierter BT7-H Zellen. Die Markierung entsprach den bisher in Immunfluoreszenzanalysen für die Membranen des cis- und mittleren Golgi-Apparates beschriebenen Strukturen (Saraste et al., 1986; Tang et al., 2001). Die Verwendung des Antikörpers gegen GP130 führte zur gleichen Markierung in der Immunfluoreszenz (nicht gezeigt).

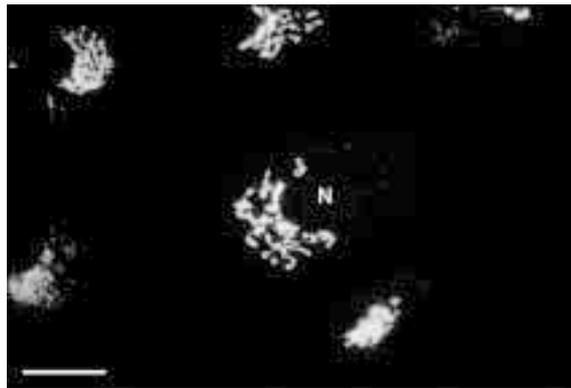


Abb. 25: Der Golgi-Marker Giantin in der Immunfluoreszenz. Uninfizierte und mit anti Giantin-Antikörper und dem Cy3- Konjugat inkubierte BT7-H Zellen zeigen eine deutliche perinukleäre Markierung der Membranen des cis- und mittleren Golgi, die oft in Ringform auftritt. Maßstab: 20 µm, N = Nukleus.

3.6. Untersuchung des Ursprungs der Poliovirus-Vesikel in infizierten Zellen mittels Immunfluoreszenz

In der vorliegenden Arbeit wurden Antikörper gegen die beschriebenen Marker des ER und des Golgi- Apparates in Immunfluoreszenz-Untersuchungen von Poliovirus infizierten BT7-H Zellen eingesetzt. Bei einer Kolo-kalisation eines oder mehrerer dieser zellulären Marker mit dem Marker für die Poliovirus-Vesikel, dem PV-Protein 2B, sollten dadurch Aussagen über den Entstehungsort der Poliovirus-Vesikel gewonnen werden. Dafür wurde die Lokalisation dieser Marker sowohl im konventionellen Fluoreszenzmikroskop, als auch im konfokalen Mikroskop untersucht.

Untersuchung des ER in Poliovirus-infizierten BT7-H Zellen mittels konventioneller Fluoreszenzmikroskopie

Zur Untersuchung des Ursprungs der Poliovirus-Vesikel wurden BT7-H Zellen 4 h nach der Infektion mit Poliovirus Sabin1 für die Immunfluoreszenz fixiert und mit den Kaninchen-Antikörpern gegen die ER-Membranproteine p63 bzw. MERG und dem monoklonalen Antikörper gegen den Marker der Poliovirus Vesikel 2B markiert. Nach der Visualisierung mit dem anti Kaninchen-Konjugat GAR-Cy2 (grün) und dem anti Maus-Konjugat GAR-Cy3 (rot), wurde die Verteilung der Signale im konventionellen Fluoreszenzmikroskop untersucht. In Abbildung 26a ist eine PV-infizierte Zelle neben einer uninfizierten Zelle dargestellt. Die infizierte Zelle war schon in einer fortgeschrittenen Phase des Infektionszyklus und zeigte daher ein deutliches Signal für das PV-Protein 2B, während die uninfizierte Zelle nur ein schwaches Hintergrundsignal des 2B-Antikörpers zeigte. Die Markierung des ER der selben Zellen durch den Marker p63 führte in der uninfizierten Zelle zu der für die BT7-H Zellen typische Textur des ER (Abb. 26b).

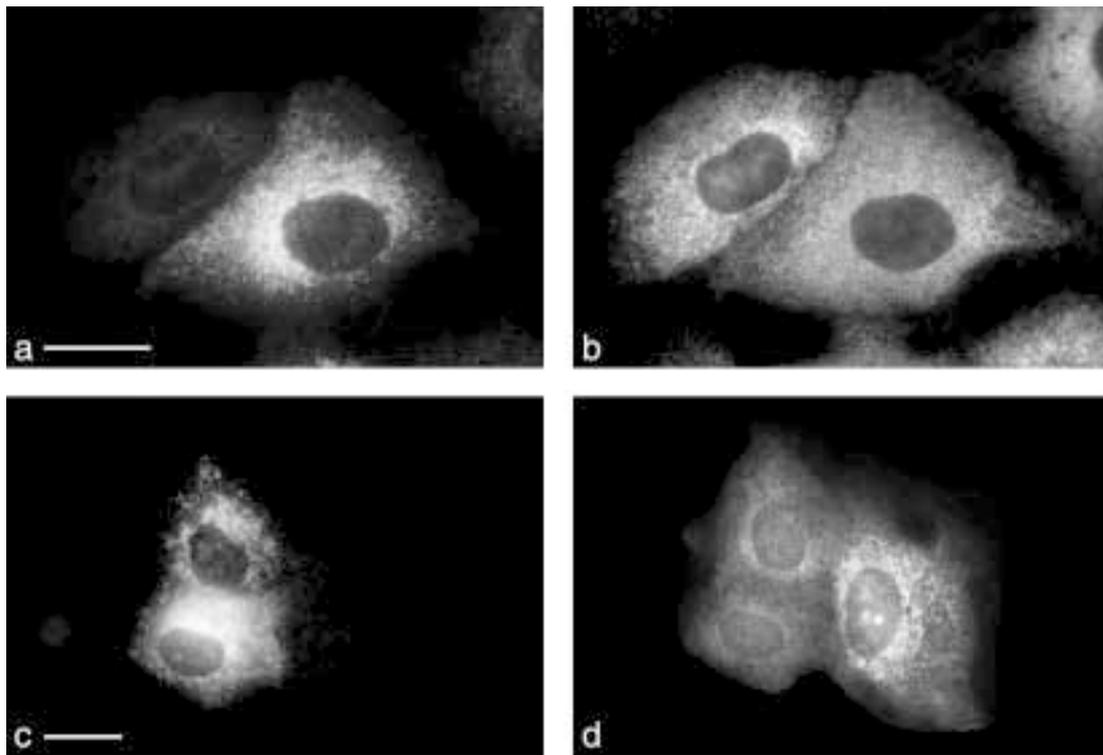


Abb. 26: Texturänderung des ER in Poliovirus-infizierten Zellen. Mit Poliovirus Sabin1 infizierte BT7-H Zellen wurden 4 h nach der Infektion fixiert und mit den Antikörpern gegen PV-2B (a und c), bzw. gegen die ER Marker p63 (b) und MERG (d) inkubiert. Die grobe Textur des ER mit der deutlichen Fluoreszenz der ER Marker ist in den stark 2B-exprimierenden Zellen nicht mehr vorhanden. Maßstäbe: 20 μm (a und c).

Das ER-Netzwerk war über das gesamte Cytoplasma der Zelle verteilt und zeigte eine gröbere, stark fluoreszierende Textur im perinukleären Bereich des Cytoplasma. In der PV-infizierten Zelle war diese grobe Textur nicht vorhanden und das Netzwerk des ER erschien bedeutend feiner strukturiert als in der uninfizierten Zelle. Die Fluoreszenzintensität des ER-Markers war im ganzen Cytoplasma der PV-infizierten Zelle schwächer als in der uninfizierten Zelle, insbesondere das perinukleäre Cytoplasma zeigte nach der Infektion keine deutlich fluoreszierende Textur mehr. Die Markierung mit dem zweiten verwendeten ER-Marker, dem Antikörper gegen MERG, führte zu den gleichen Ergebnissen bezüglich der beobachteten Texturänderung des ER in der Infektion mit Poliovirus Sabin1. In Abbildung 26c sind drei zusammenliegende Zellen dargestellt, von denen eine nicht infiziert war und sich die zweite in einer frühen Phase der Infektion mit Poliovirus Sabin1 befand und daher nur ein mittelstarkes Signal des Antikörpers gegen 2B zeigte. Die dritte dieser Zellen wies ein starkes Signal des 2B-Markers auf, befand sich also in einer späteren Phase der Infektion. In Abbildung 26d ist die Texturänderung des ER-Signals der selben drei Zellen, die mit anti MERG markiert waren, deutlich zu erkennen. Von der uninfizierten Zelle über die frühen Phasen der Infektion bis zu den späten Phasen der Infektion nahm also die starke Fluoreszenz und die grobe Textur der ER-Markierung im perinukleären Bereich des Cytoplasma immer mehr ab, dies spricht dafür, daß die Phase der Infektion (die Menge des Proteins 2B in der Zelle) mit der Änderung der ER-Textur korreliert.

Zu den gleichen Zeitpunkten nach der Infektion mit dem Antikörper gegen GalT durchgeführte Immunfluoreszenz-Untersuchungen des Golgi-Apparates der infizierten Zellen zeigten, daß in den beschriebenen Stadien der Infektion der Golgi-Apparat unverändert und noch nicht desintegriert war (nicht gezeigt).

Die mit zwei verschiedenen ER-Markern nachgewiesene Texturänderung des ER während der Infektion ließ vermuten, daß die ER-Membranen schon frühzeitig in die Bildung der Poliovirus-Vesikel involviert sein könnten. Allerdings konnte anhand der Bilder des konventionellen Fluoreszenzmikroskops keine Aussage über eine eventuelle Kolokalisation des Vesikel-Markers 2B mit den ER-Markern gemacht werden, da bei dieser Methode die Auflösung der Z-Achse der Präparate nicht ausreichend war.

Untersuchungen des ER und der Poliovirus-Vesikel im konfokalen Mikroskop

Die ersten Versuche, eine Kolokalisation zellulärer Marker mit dem PV-Vesikelmarker im CLSM nachzuweisen, wurden durch die Aufnahme einzelner optischer Schnitte durch die Präparate durchgeführt. Dabei wurde der Vorteil des CLSM ausgenutzt, daß damit ausschließlich die Fluoreszenzsignale einer Fokusebene von bis zu 100 Nanometern im Präparat dargestellt werden können, während die Signale der anderen Ebenen weitgehend ausgeblendet werden. Die Untersuchungen der Kolokalisation zellulärer Marker mit dem Marker für die PV-Vesikel mit dieser

Methode führten zu widersprüchlichen Ergebnissen. Dabei ergab sich in einigen Zellen ein hoher Grad der Kolokalisation, in anderen Zellen des gleichen Präparates aber keine Kolokalisation beider Marker. Dies war offenbar auf die Tatsache zurückzuführen, daß die noch vorhandene Streufluoreszenz besonders des Fluorochroms zur Detektion des ER-Markers zu falsch-positiver Kolokalisation mit den Signalen des anti 2B-Antikörpers führte. Außerdem konnte innerhalb eines optischen Schnittes von geringer Dicke nur ein kleiner Teil der Zelle abgebildet werden. Dies hatte insbesondere für die Untersuchung solch unterschiedlicher Strukturen, wie dem Netzwerk des ER und den Poliovirus-Vesikeln negative Folgen, da somit die Kolokalisation der Marker für diese Strukturen nicht eindeutig bestimmt werden konnte. Aufgrund dieser Unsicherheiten bei den einfachen Z-Schnitten wurden in den weiteren Versuchen mit dem CLSM Aufnahmen von Serien optischer Schnitte durchgeführt, mit denen die Zellen in ihrer gesamten vertikalen Ausdehnung analysiert werden konnten.

3.7. Darstellung der Poliovirus-Vesikel und des ER durch konfokale Mikroskopie, Dekonvolution und 3D-Rekonstruktion

Da die Untersuchung der optischen Einzelschnitte des CLSM zu widersprüchlichen Ergebnissen bezüglich der Kolokalisation der zellulären und viralen Marker geführt hatte, wurden die weiteren Untersuchungen der Präparate mit optischen Serienschnitten der konfokalen Mikroskopie und der anschließenden 3D-Rekonstruktion der erhaltenen Bildstapel durchgeführt.

Darstellung der Kolokalisation des ER-Markers p63 mit dem Marker der Poliovirus-Vesikel durch 3D-Rekonstruktion

Zunächst wurde der ER-Marker p63 für die Experimente mit der konfokalen Mikroskopie und der Dekonvolution eingesetzt. In den Abbildungen 27 bis 30 sind alle Darstellungsformen durch die dafür verwendeten Imaris-Software anhand einer dekonvoluierten Schnittserie durch eine mit anti p63 (grün) und anti 2B (rot) Antikörpern markierte BT7-H Zelle 3.30 h nach der Infektion mit Poliovirus Sabin1 dargestellt. Mit diesen verschiedenen Abbildungsarten konnte die Verteilung der mit den Signalen der beiden markierten Proteine assoziierten Strukturen durch die gesamte Z-Achse der Zellen analysiert werden. Anhand des Beispiels einer Struktur (Pfeil in Abbildungen 27 bis 30) wird dargestellt, welche Informationen sich aus diesen verschiedenen Abbildungen entnehmen lassen. In Abbildung 27a und b sind die MIPs (also Projektionen durch die gesamte Z-Achse des Präparates) der im konfokalen Mikroskop aufgenommenen Bildstapel des Signals des Proteins 2B (a, rot) und des Proteins p63 (b, grün) vor der Dekonvolution zu erkennen. Im Vergleich mit den MIPs der selben Bildstapel nach der Dekonvolution (c und d) ist zu erkennen, daß die angewandte Methode zu einer deutlichen Verbesserung der Auflösung der erhaltenen Bilder führte (Abb. 27c und d). Auf diesen MIPs der dekonvoluierten Schnittserie sind durch 2B-markierte Poliovirus-

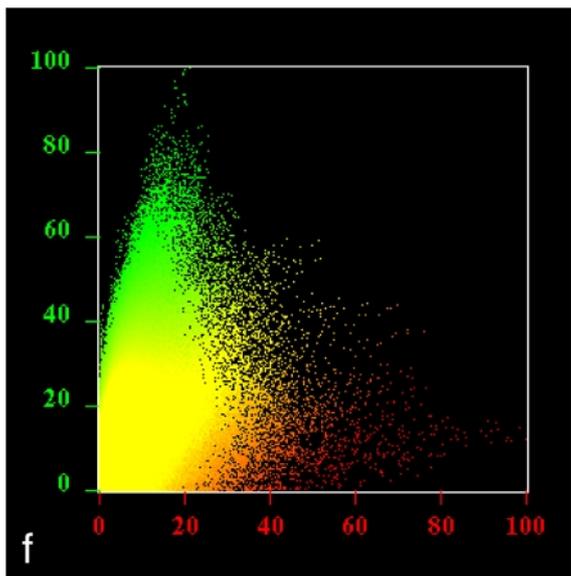
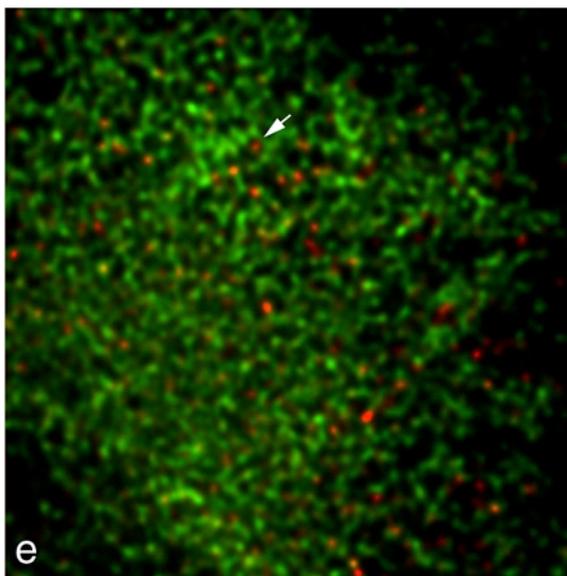
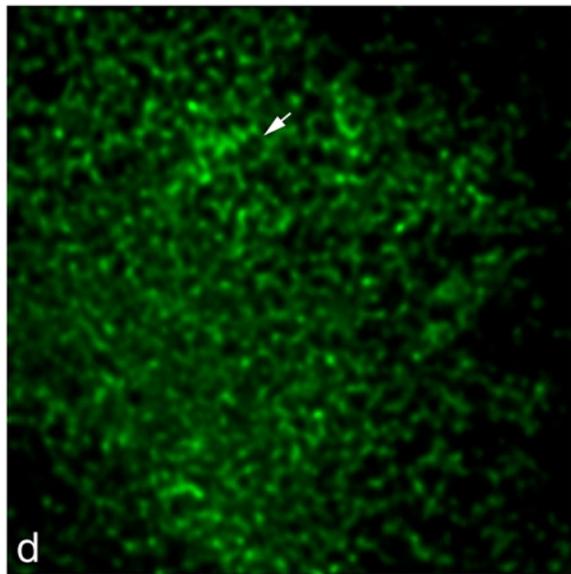
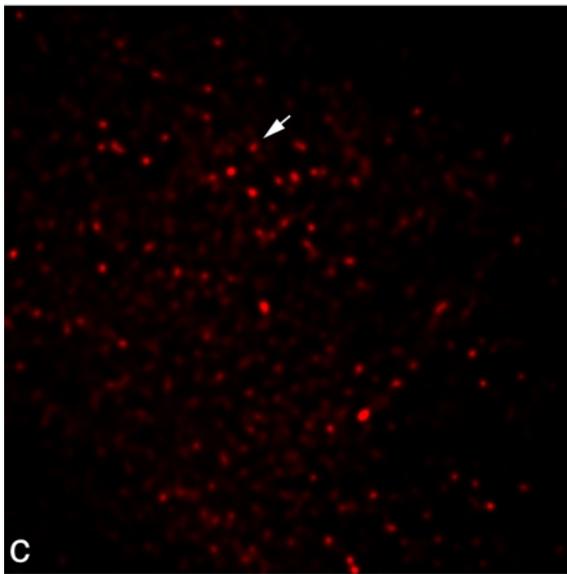
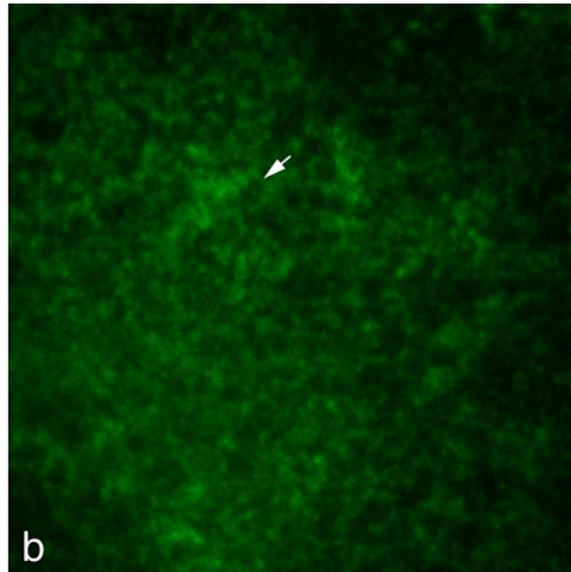
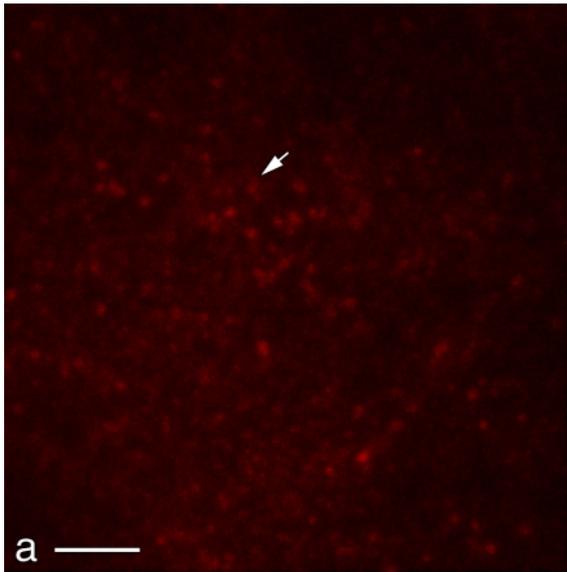


Abb. 27

Vesikel (c, rot), sowie das Netzwerk des ER (d, grün) zu erkennen, die vor der Dekonvolution nicht klar darstellbar waren. Nach der Überlagerung beider Kanäle (Abb. 27e) wurden sowohl nicht kolokalisierende Bereiche der Vesikel detektiert, als auch Strukturen beobachtet, die eventuell eine Kolokalisation beider Marker zeigten. Die Strukturen, an denen beide Marker vorkamen, konnten erst nach der Definition der Kolokalisation im korrespondierenden Histogramm des Bildstapels bestimmt werden (siehe Teil: Material und Methoden), in dem die statistische Verteilung der Fluoreszenzintensitäten im gesamten Bildstapel dargestellt wurde (Abb. 27f). Das Histogramm zeigt eine überwiegend getrennte Verteilung der Fluoreszenz beider Kanäle, die durch die Verteilung der Voxel entlang der beiden Achsen des Histogramms dargestellt wird (vergleiche mit Teil: Material und Methoden). Diese beiden Populationen stellen Voxel dar, die hohe Fluoreszenzintensitäten für nur eins der beiden Signale aufweisen. Dagegen finden sich nur wenige Voxel mit gleichen Fluoreszenzintensitäten für beide Kanäle, die im Bereich der 45 Grad-Achse des Histogramms vorkamen. Das spricht dafür, daß nur ein kleiner Anteil beider Marker in diesen Präparaten kolokalisiert. Neben der Population der Voxel mit hohen Intensitäten des ER-Markers p63 (grün), existiert ebenfalls eine deutliche, jedoch kleinere Population von Voxel, die ausschließlich Signal des 2B-Markers (rot) aufwiesen. Durch die Verteilung der rein grünen Voxel wurde deutlich, daß es bei der Aufnahme der Bilder im CLSM zum leichten Durchbluten des roten Kanals in den grünen Kanal gekommen war. Dies wird deutlich durch die linear mit der Fluoreszenzintensität der rein grünen Pixelpopulation zunehmenden Abweichung von der Y-Achse des Histogramms. Da die Stärke des Durchblutens proportional zur Signalintensität steigt, ist dies ein deutlicher Hinweis auf Durchbluten eines Fluorochroms in den zweiten Kanal. Der auch nach der Dekonvolution verbliebene Hintergrund, der bei hoher Vergrößerung der Bilder bestimmt werden konnte, betrug maximal 6% (15 von 256 Graustufen) in beiden Kanälen. Um weder das Durchbluten noch den verbliebenen Hintergrund als falsch-positive Kolokalisation zu detektieren, wurden die Schwellenwerte für die Kolokalisation auf den jeweils höheren dieser beiden Werte festgesetzt. Da die Fluoreszenzintensitäten

Abb. 27: Darstellung der Poliovirus-Vesikel und des ER in Bildstapeln der konfokalen Mikroskopie. Ausschnitt einer BT7-H Zelle 3.30 hpi nach der Infektion mit Poliovirus Sabin1. Das ER der Zellen wurde mit dem Antikörper gegen p63 und die PV-Vesikel mit dem AK gegen PV-2B bzw. den Konjugaten Cy2 und Cy3 markiert. Nach der Aufnahme von Bildserien im CLSM wurden Projektionen durch die ganze Dicke der Zelle (MIP) vor (a und b) und nach Dekonvolution (c und d) abgebildet. Dadurch ist die Erhöhung der Auflösung der Rohdaten durch die Dekonvolution zu erkennen. Der rote Kanal (a, PV-2B) und der grüne Kanal (b, p63) wurden nach der Dekonvolution übereinandergelegt (MIP, e) und die Fluoreszenzintensitäten beider Kanäle im korrespondierenden Histogramm dargestellt (f). Diese Bilder zeigen, daß die Signale der Marker für das ER und für die Poliovirus-Vesikel sowohl getrennt vorkommen, als auch wenig Kolokalisation zeigen. Maßstab: 3 µm, (Pfeil: Lokalisierung eines Poliovirus-Vesikels).

des Durchblutens bei den verwendeten Aufnahmebedingungen über denen des nach der Dekonvolution verbliebenen Hintergrunds waren (siehe Material und Methoden und Abbildung 14), wurden die Schwellenwerte der Kolokalisation für den grünen Kanal bei 10% (25 der maximalen 256 Graustufen bei 8 bit) und für den roten Kanal bei 17% (44 der maximalen 256 Graustufen bei 8 bit) festgelegt (siehe Abbildung 14). Nach der Definition der Kolokalisation und deren Markierung im Bildstapel (gelb), konnte die Kolokalisation beider Signale durch die gesamte Zelle im korrespondierenden MIP beurteilt werden (Abb. 28a). In dieser Übereinanderlagerung aller Z-Schnitte des Bildstapels ist zu erkennen, daß die Bereiche, in denen beide Marker vorkamen, häufig in charakteristischen Formen auftraten. Oft war die Kolokalisation in Form von offenen und geschlossenen Ringen, sowie halbmondförmigen Strukturen zu sehen. Es fiel auf, daß in der Mitte der ringförmigen Bereiche der Kolokalisation oft ein rein rotes Signal (PV-2B) vorkam, das von den Bereichen der Kolokalisation umschlossen war. Jedoch konnte anhand der MIPs nicht beurteilt werden, ob die Bereiche der Kolokalisation und die Bereiche mit ausschließlichem Signal einer der beiden Marker auf den gleichen Strukturen vorkamen. Um diese Informationen zu erhalten, wurde die Verteilung der Signale und der Kolokalisation zunächst mit Hilfe der sogenannten X-Y-Z-Projektionen beurteilt, die eine Beurteilung der Verteilung der Signale über die gesamte vertikale Ausdehnung der Zelle ermöglichten. In Abbildung 28b ist die X-Y-Z-Projektion des gleichen Bildes wie in Abbildung 28a dargestellt. Hier konnte gezeigt werden, daß die kolokalisierenden Bereiche beider Marker direkten Kontakt mit Bereichen hatten, die ausschließlich mit einem der beiden Antikörper markiert wurden (Pfeilspitze). Weiterhin konnte anhand der X-Y-Z-Projektionen ein Ausbleichen der Fluorochrome während der Aufnahme durch den Bildstapel hinweg ausgeschlossen werden. Dies hätte durch die sukzessive Abnahme der Fluoreszenzintensität vom oberen Ende des Präparates (Beginn der Aufnahme der Einzelbilder) bis zum unteren Ende des Präparates gezeigt werden können, kam jedoch unter den verwendeten optimierten Aufnahmebedingungen nicht vor.

Im nächsten Schritt wurden die einzelnen Signale beider Kanäle und deren Kolokalisation auf ihre Verteilung durch die einzelnen Schnitte hinweg untersucht. Dazu wurde der Bildstapel nach der Dekonvolution wieder in die einzelnen Z-Schnitte zerlegt und diese als Galerie optischer Einzelschnitte mit verbesserter Auflösung gegenüber den Rohdaten aus dem CLSM analysiert (Abb. 29a). Zunächst konnte auf den Z-Schnitten, die mit einer Dicke von ca. 70 nm überlappende Bereiche des Präparates darstellen, der Verlauf der schon zuvor im MIP detektierten ringförmigen Kolokalisation beobachtet werden. Anhand eines Beispiels (Pfeil) konnte visualisiert werden, wie ausgehend von einem Teil der ER-Membranen am oberen Pol der Zelle die kolokalisierenden Bereiche durch die Zelle hinweg zunahmen. Der offene Ring der Kolokalisation schloß sich und ging weiter in eine vesikuläre Struktur über, an der keine Kolokalisation mehr detektiert werden konnte, sondern die ausschließlich durch den anti 2B-Antikörper (Cy3-Konjugat, rot) markiert wurde. Die Verteilung der Fluoreszenzintensitäten in den einzelnen Schnitten wurde anschließend

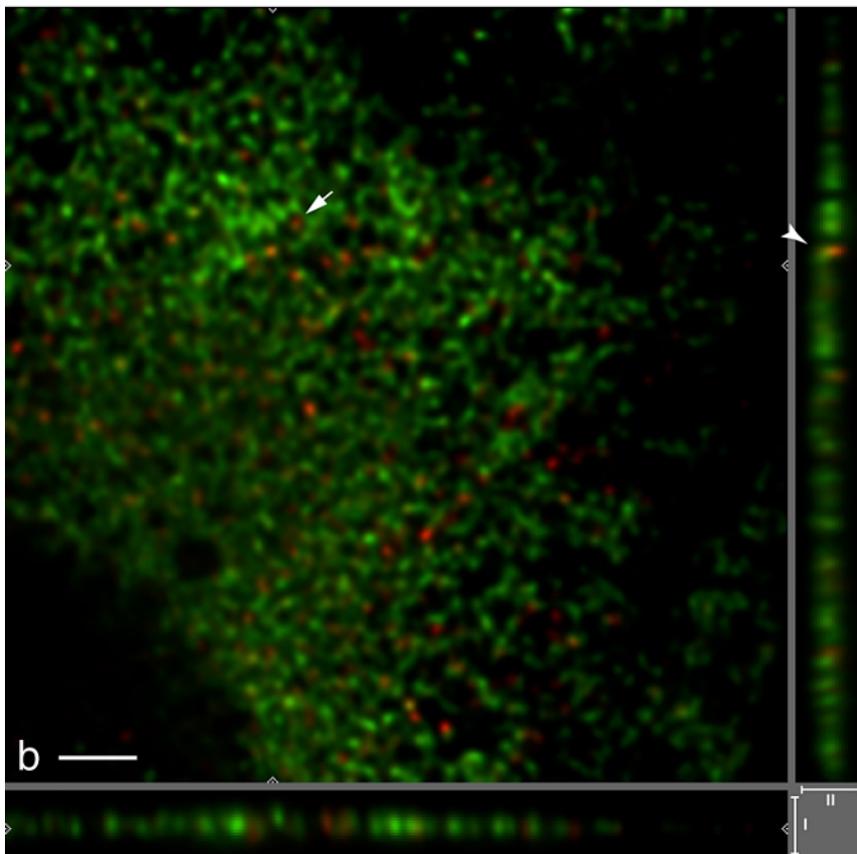
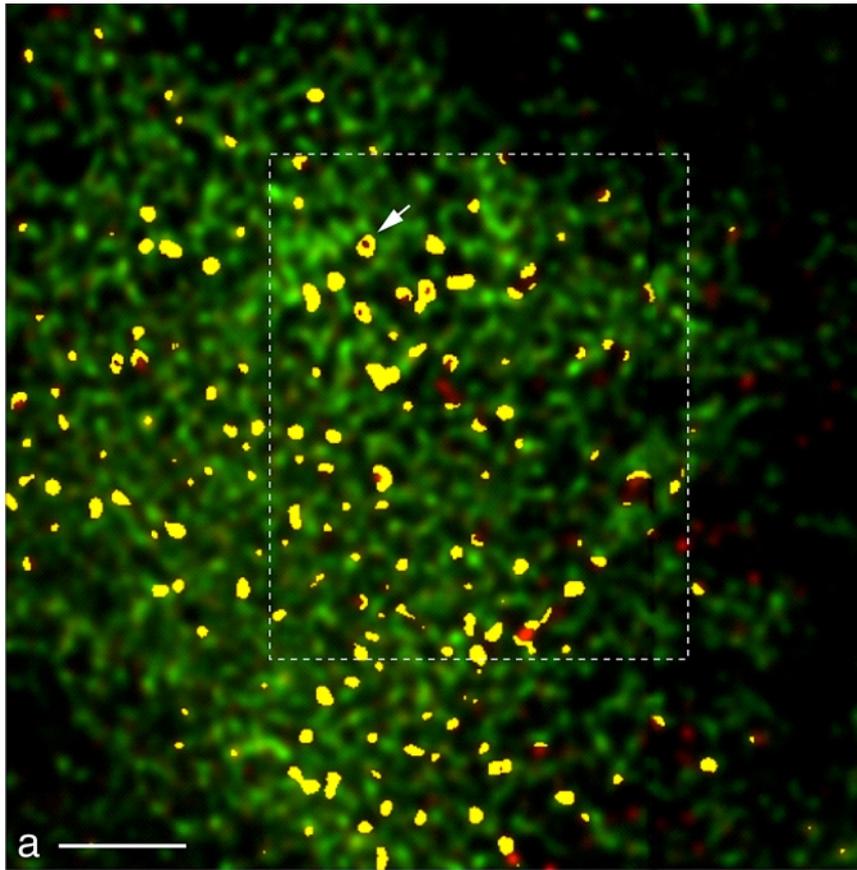


Abb. 28

statistisch aufgetragen und in den mit den Einzelschnitten korrespondierenden Histogrammen analysiert. In Abbildung 29b ist eine zur Galerie in Abbildung 29a korrespondierende Serie von Histogrammen zu sehen. Diese Histogramme bestätigten, ohne strukturelle Informationen über die Verteilung der Fluorochrome zu geben, daß ausgehend vom Netzwerk der ER-Membranen (grünes Signal, Y-Achse) Bereiche der Kolokalisation mit PV-2B auftraten, die jedoch auf die zentralen Bereiche der Zelle beschränkt war. Im weiteren Verlauf der Z-Achse des Präparates gingen diese Bereiche der Kolokalisation in ein überwiegend rotes oder rein rotes Signal (anti PV-2B, X-Achse) über. Dabei war zu erkennen, daß innerhalb des Bereichs der Kolokalisation verschiedene Zusammensetzungen der beiden Fluorochrome auftraten. Einzelne Histogramme zeigten spezifische Populationen (fingerförmige Wolken von Voxeln), die nur in einem Schnitt bzw. in wenigen aufeinanderfolgenden Schnitten vorkamen. Mit der Auswahl einzelner Voxel-Populationen und der Untersuchung der damit korrelierenden Strukturen ließ sich zeigen, daß diese Strukturen isoliert waren und das Verhältnis beider Signale innerhalb bestimmter Regionen variierte (nicht gezeigt).

Da weder die X-Y-Z-Sektionen noch die einzelnen Z-Schnitte für die detaillierte Aufschlüsselung der mit den Fluoreszenzsignalen assoziierten Strukturen ausreichend waren, wurden dreidimensionale Rekonstruktionen und Oberflächendarstellungen (Isosurface) einer Subregion des gesamten Bildstapels durchgeführt. Diese Darstellungsform ermöglichte die detaillierte dreidimensionale Beurteilung der Strukturen die durch die verschiedenen Antikörper markiert wurden. Abbildung 30a zeigt die 3D-Rekonstruktion des in Abbildung 28a markierten Ausschnitts des dekonvoluierten Bilderstapels einer infizierten Zelle 3.30 h nach Infektion. Die Mehrzahl der mit dem 2B-Marker detektierten Vesikel (rot) sind an den Membranen des ER lokalisiert. Die mit dem 2B-Marker markierten Vesikel weisen kein p63-Protein auf ihren Membranen auf. Die Kolokalisation (gelb) des ER-Markers p63 und des Markers für die viralen Vesikel (2B) ist auf distinkte Bereiche des ER beschränkt. Die erste, prominentere Erscheinungsform der Kolokalisation waren Bereiche, an denen die Poliovirus-Vesikel und die Membranen des ER in Kontakt waren. Die Kolokalisation war dort auf die Übergangsbereiche beider Strukturen beschränkt, und lag in

Abb. 28: Darstellung der Kolokalisation der Marker für die Poliovirus-Vesikel und das ER in MIP und X-Y-Z-Projektion. Nach der Definition der Kolokalisation der Marker p63 und 2B wurden die kolokalisierenden Bereiche in das MIP der Abb. 28e eingezeichnet (a). Die Kolokalisation kommt hauptsächlich in Form von offenen und geschlossenen Ringen vor und umschließt häufig Bereiche von rein roter Fluoreszenz des PV-2B-Markers (Pfeil). Die X-Y-Z-Projektion der selben Bilderserie (b) zeigt, daß das rote Signal des 2B-Markers sowohl einzeln als auch in Kontakt mit dem ER (Pfeilspitze) vorkommt und daß es bei der Aufnahme der Bildserie nicht zum Ausbleichen der Marker gekommen war. Maßstäbe: 3 µm (a und b).

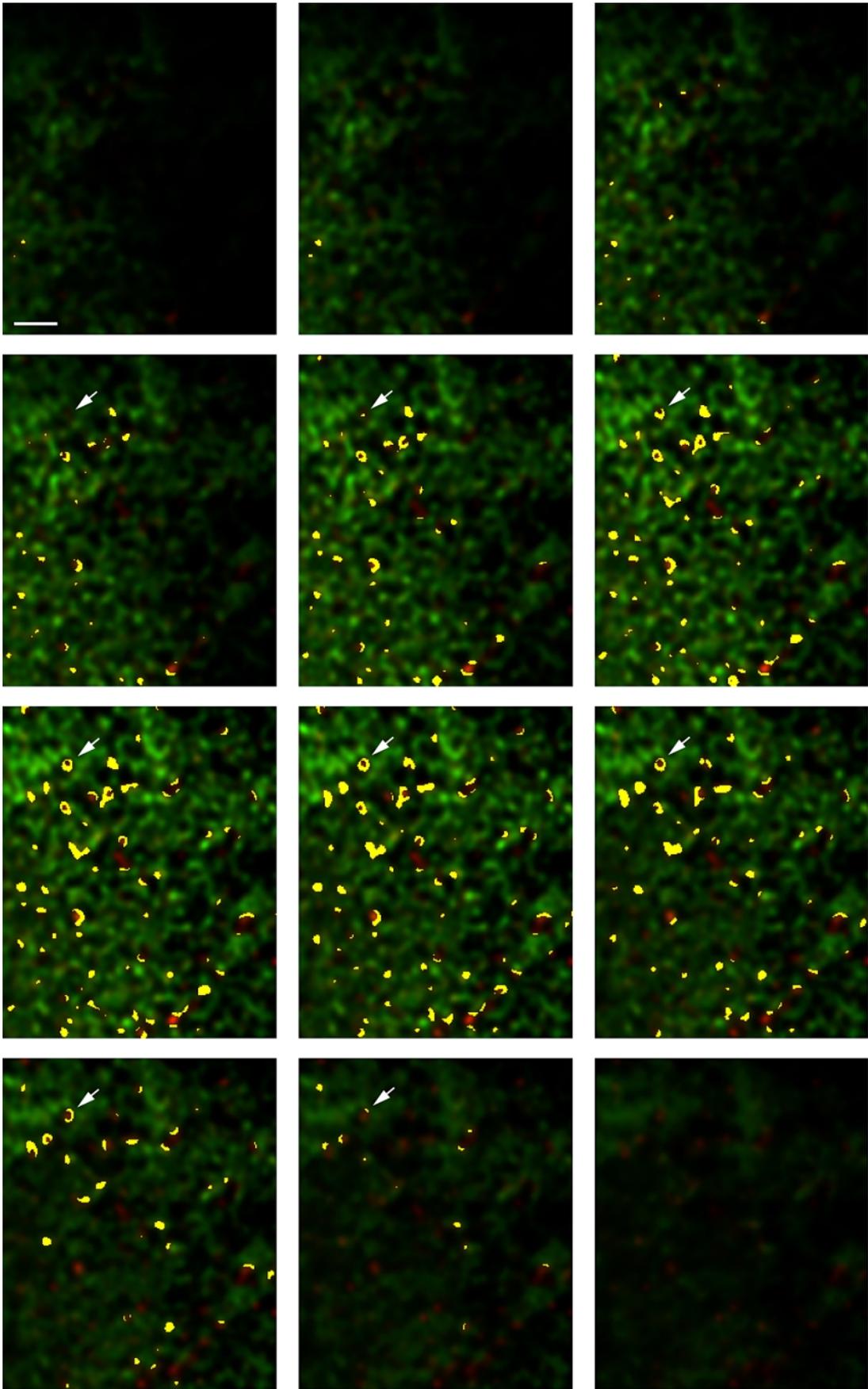


Abb. 29a

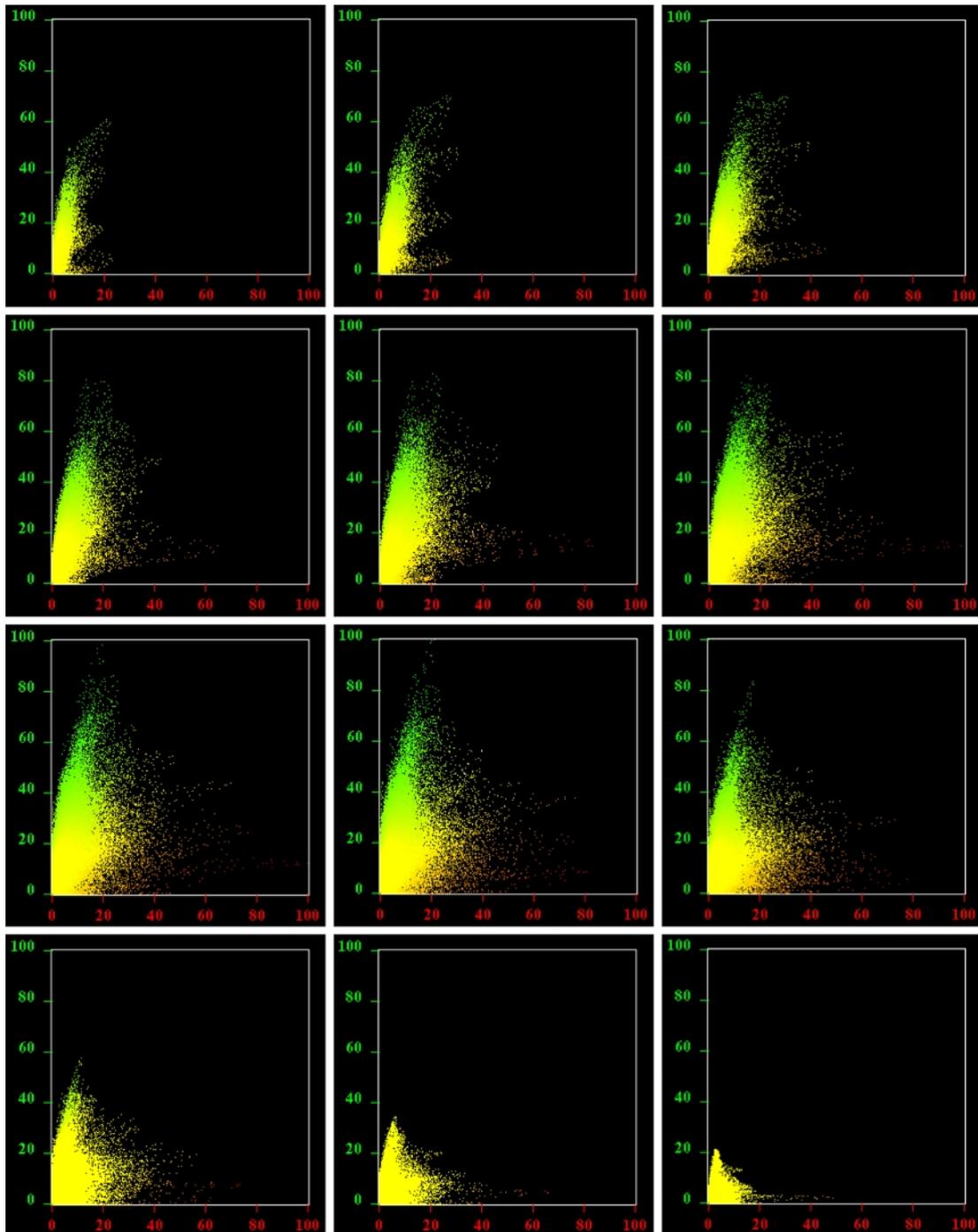


Abb. 29: Einzelne optische Schnitte und Histogramme zeigen die Verteilung der Marker für das ER und die Poliovirus-Vesikel in der infizierten Zelle. Die Bildserie der Abbildungen 27 und 28 wurden nach der Dekonvolution in die einzelnen optischen Schnitte (a) und die korrespondierenden Histogramme (b, s. oben) aufgeteilt. Die Darstellung einer repräsentativen Struktur durch die Zelle (Pfeile in a) zeigt, daß sie Kolokalisation beider Marker von einem offenen über einen geschlossenen Ring an den ER-Membranen verläuft und am unteren Zellpol in eine rein rote vesikuläre Struktur (PV-2B) übergeht. In den Histogrammen wurden verschiedene distinkte Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten beider Kanäle gefunden (Fingerförmige Pixelwolken in b). Die Höhe der überlappenden optischen Schnitte ist ca. 70 nm. Maßstab: 1 μ m.

Form von Ringen vor, die wie ein „Kragen“ die ER-Membranen und die Vesikel miteinander verbanden. Diese in der dreidimensionalen Darstellung detektierten Übergangsbereiche zwischen ER und Vesikeln entsprachen offenbar den Ringen, die schon im MIP dargestellt werden konnten (siehe Pfeile in Abbildung 28a und 29a). Aus dieser Beobachtung kann abgeleitet werden, daß der ER-Marker p63 an den Membranen der Poliovirus-Vesikel nicht vorkommt, sondern beide Signale nur dann regional begrenzt zusammen auftreten, wenn Poliovirus-Vesikel an den Membranen des ER vorkommen.

Die zweite, seltenere Erscheinungsform der Kollokalisierung waren flache Bereiche auf den ER-Membranen, in denen die Marker kollokalisieren (gelb). Diese Bereiche der Kollokalisierung zeigten keine vesikuläre Struktur und waren nicht auf den Membranen des ER vorgewölbt, daher stellen sie Teile der ER-Membranen dar, die sich morphologisch - soweit feststellbar - nicht von den anderen Bereichen der ER-Membranen unterscheiden, aber das sonst nur in Vesikeln vorkommende virale 2BC bzw. 2B Protein tragen. Die Flecken der Kollokalisierung beider Marker auf den Membranen des ER deuten darauf hin, daß dort das Protein 2B bzw. 2BC konzentriert vorliegt, aber dort keine Poliovirus-Vesikel vorhanden sind.

Mit diesen Versuchen konnte gezeigt werden, daß erstens der Marker für die ER-Membranen, p63 nicht in den Membranen der Poliovirus-Vesikel vorhanden war. Zweitens war eine Kollokalisierung des viralen Vesikelmarkers 2B mit dem ER-Membranmarker p63 nur an solchen Vesikeln zu detektieren, die in Kontakt mit dem ER waren und nur dort auf die Kontaktstellen beider Strukturen beschränkt. Die Ergebnisse dieser Experimente führten zur Vermutung, daß die am ER visualisierten Poliovirus-Vesikel von den Membranen des ER absprossen, nachdem die viralen Proteine an den Membranen des ER konzentriert wurden. Allerdings kann mit diesen Ergebnissen noch nicht gezeigt werden, ob die detektierten Vesikel aus dem ER kommen, oder mit dem ER fusionieren.

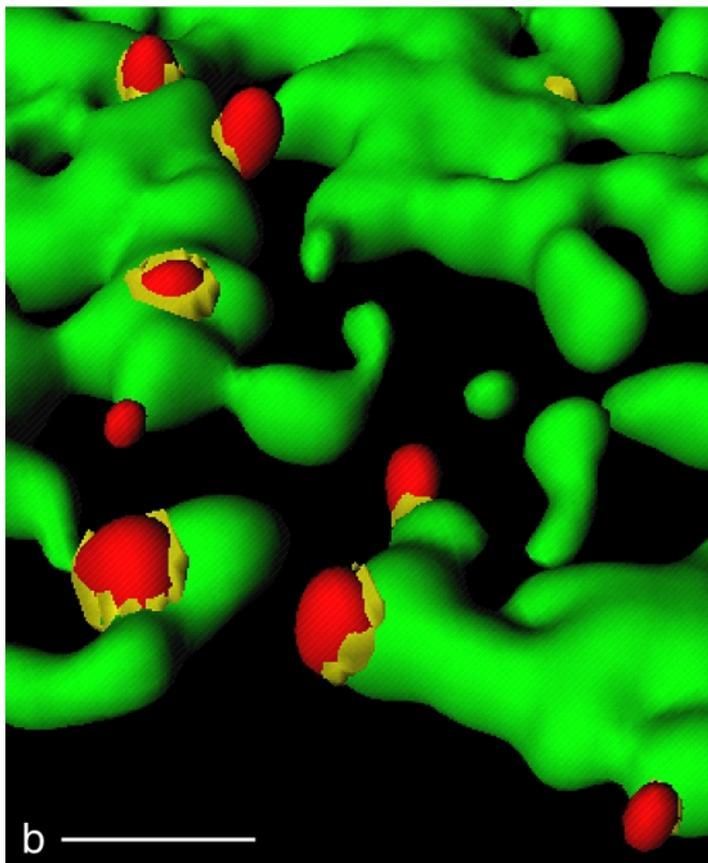
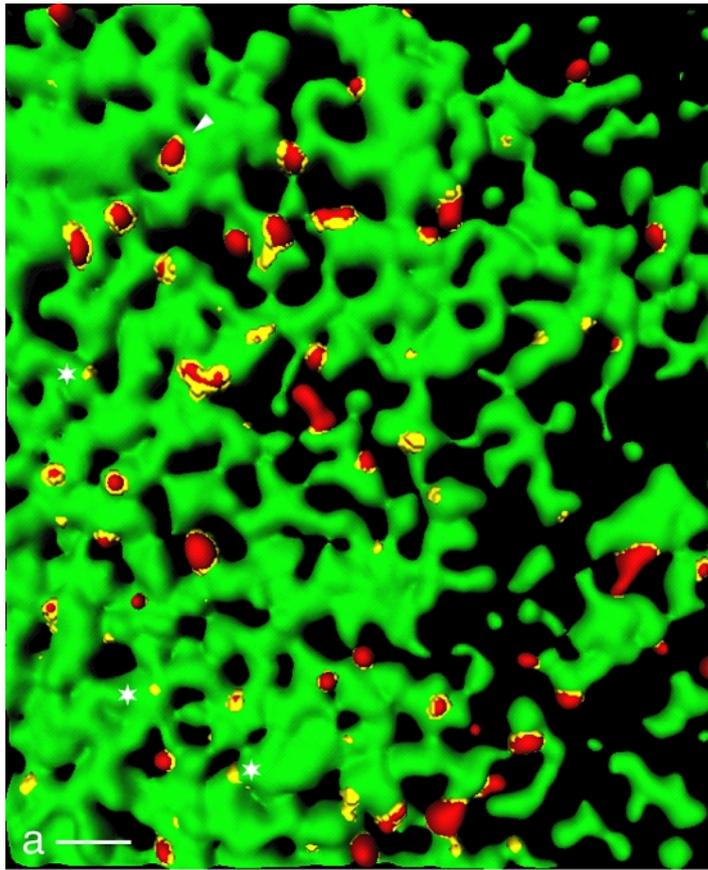


Abb. 30

Darstellung der Kolokalisation des ER-Markers MERG mit dem Marker der Poliovirus-Vesikel durch 3D-Rekonstruktion

Um neben dem spezifischen Marker p63 weitere ER-Membranproteine auf ihre Anwesenheit in den Membranen der Poliovirus-Vesikel zu testen, wurde der ER-Marker MERG („major ER glycoproteins“) zusammen mit dem 2B-Marker in Immunfluoreszenzanalysen infizierter BT7-H Zellen verwendet (D. Meyer, persönliche Mitteilung). Zur Herstellung des anti-MERG Antikörper wurden ER-Membranen solubilisiert und als Antigen für die Immunisierung von Kaninchen verwendet. Dadurch detektierte das erhaltene Antiserum ein breites Spektrum der in den Membranen des ER enthaltenen Proteine, die allerdings nicht genauer charakterisiert wurden. Die spezifische Markierung der ER-Membranen durch den anti-MERG Antikörper zeigt das MIP-Bild der Abbildung 31a, in der das Netzwerk des ER (grün) nach Dekonvolution wie bei der Markierung mit p63 dargestellt wurde. Die Kernmembran der Zelle, die in die Membranen des ER übergeht, war jedoch wie bei p63, nicht markiert (nicht gezeigt). Dies demonstriert, daß durch anti-MERG Membranproteine detektiert werden, die ausschließlich in den ER-Membranen lokalisiert sind, der anti-MERG Antikörper also spezifisch für die Membranen des ER ist. Die Verteilung der Fluoreszenz in der Zelle entsprach der des p63-Markers da ein Vorversuch in uninfizierten Zellen mit der Immunfluoreszenz mit anti-MERG und mit einem mka gegen p63 ein hohes Maß an Kolokalisation dieser beiden Marker demonstrierte (nicht gezeigt). In den Poliovirus-infizierten BT7-H Zellen zeigte sich nach der Detektion des 2B (rot) und des MERG (grün) die Kolokalisation beider Marker - ähnlich wie bei der p63-Detektion - überwiegend in ringförmigen Bereichen, die nur mit 2B markierte Bereiche umgaben, deren Morphologie kompatibel mit den Poliovirus-Vesikeln war. In der korrespondierenden 3D-Rekonstruktion ergaben sich die gleichen Beobachtungen, wie zuvor beim p63-Marker (Abb. 31b). Also war auch das breite Spektrum der durch den anti-MERG Antikörper markierten ER-Membranproteine nicht an den Membranen der Poliovirus-Vesikel detektierbar. Die Kolokalisation beider Marker kam ebenfalls wie bei der p63-Markierung, nur auf Vesikeln vor, die in Kontakt mit den Membranen des ER waren und war auf die ringförmigen Übergangsbereiche zwischen den Vesikeln und den ER-Membranen und seltener auf kleine Bereiche

Abb. 30: 3D-Rekonstruktion Poliovirus-infizierter Zellen; Poliovirus-Vesikel sind an den Membranen des ER lokalisiert, aber die Kolokalisation der Marker ist auf die Kontaktstellen beider Strukturen beschränkt. Die Abbildung ist ein Isosurface der Bildserie in den Abbildungen 28a und 29a. Die Kolokalisation des ER Markers (p63, grün) mit dem Marker der PV-Vesikel 2B (rot) ist beschränkt auf die Übergänge zwischen Vesikeln und ER (Pfeil), die PV-Vesikel weisen ansonsten kein p63-Protein auf ihren Membranen auf. Neben der Kolokalisation an der Vesikelbasis kommen beide Marker auch in flachen Bereichen auf den Membranen des ER vor (Stern). Die höhere Vergrößerung bestätigt diese Charakteristika. Maßstäbe: 1 µm (a und b).

der ER-Membranen ohne das Vorkommen von Vesikeln beschränkt. Die Ergebnisse der Untersuchungen der durch den anti MERG-Antikörper detektierten Proteine zeigen also, daß nicht nur das p63-Protein nicht auf den Poliovirus-Vesikeln vorhanden war, sondern auch alle durch den anti MERG-Antikörper detektierten ER-Membranproteine.

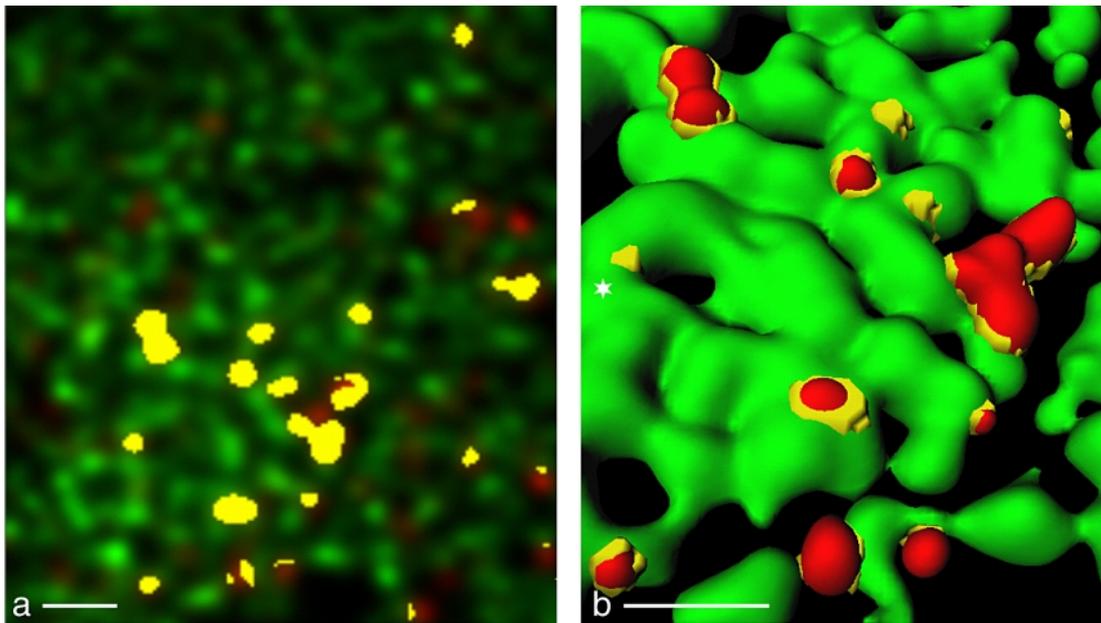


Abb. 31: 3D-Rekonstruktion Poliovirus-infizierter Zellen; die Kolokalisation der Marker MERG und 2B ist auf die Kontaktstellen des ER und der Poliovirus-Vesikel beschränkt. MIP eines Ausschnitts einer Bildserie durch eine Poliovirus-infizierte BT7-H Zelle, die mit anti MERG- (grün) und mit anti 2B-Antikörpern (rot) markiert wurde, zeigt nur eine teilweise Kolokalisation beider Marker (a). Im Ausschnitt der korrespondierenden 3D-Rekonstruktion wird deutlich, daß die MERG-Proteine - wie p63 - nur am Übergang der Poliovirus-Vesikel zum ER mit dem 2B-Marker kolokalisieren. Weiterhin kommt Kolokalisation seltener in flachen Flecken auf den Membranen des ER vor (Stern). Maßstäbe: 1 μm (a und b).

Vergleich der Poliovirus-Vesikel in der 3D-Rekonstruktion mit der Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie gilt aufgrund der hohen erreichbaren Auflösung als Referenzmethode zur Darstellung der zellulären Ultrastruktur obwohl die Darstellungsmöglichkeiten dieser Methode weitgehend auf zwei Dimensionen beschränkt sind. Da die früheren Arbeiten überwiegend durch den Einsatz der Elektronenmikroskopie zu der detaillierten Beschreibung der Poliovirus-Vesikel geführt hatten (Dales et al., 1965; Bienz et al., 1987; Egger et al., 1996; Egger et al., 2001; Suhy et al., 2001), wurden die durch die 3D-Rekonstruktion der CLSM-Bildstapel erhaltenen Informationen über die Poliovirus-Vesikel mit den elektronenmikroskopischen Daten der gleichen Infektionen verglichen. Dazu wurden BT7-H Zellen mit Poliovirus Sabin1 infiziert, die Kulturen

3.30 h nach der Infektion geteilt und sowohl für die Elektronenmikroskopie eingebettet, als auch für die Immunfluoreszenz mit dem ER-Marker p63 und dem Poliovirus-Vesikelmarker 2B fixiert (siehe Material und Methoden).

Sowohl in den 3D-Rekonstruktionen der Immunfluoreszenz-Bilder aus dem CLSM, als auch in den Dünnschnitten für die Elektronenmikroskopie konnten Vesikel-Clusters in Kontakt mit den Membranen des ER dargestellt werden. Abbildung 32a zeigt ein solches Cluster der Poliovirus-Vesikel im Elektronenmikroskop. Es besteht aus drei eng miteinander assoziierten Vesikeln (Pfeile), die in unmittelbarer Nähe der Membranen des ER lokalisiert sind. Ein weiteres Vesikel ist nicht direkt mit denen des Clusters assoziiert, es ist jedoch möglich, daß dieses Vesikel über ein weiteres - außerhalb der Schnittebene liegendes - Vesikel in Kontakt mit dem Dreier-Cluster steht. Durch die enge Assoziation der Vesikel miteinander und die Bildung von Fusionsmembranen sind die Vesikel eindeutig als Poliovirus-Vesikel zu identifizieren. Die Ribosomen an den tubulären Membranen identifizieren diese als Membranen des ER.

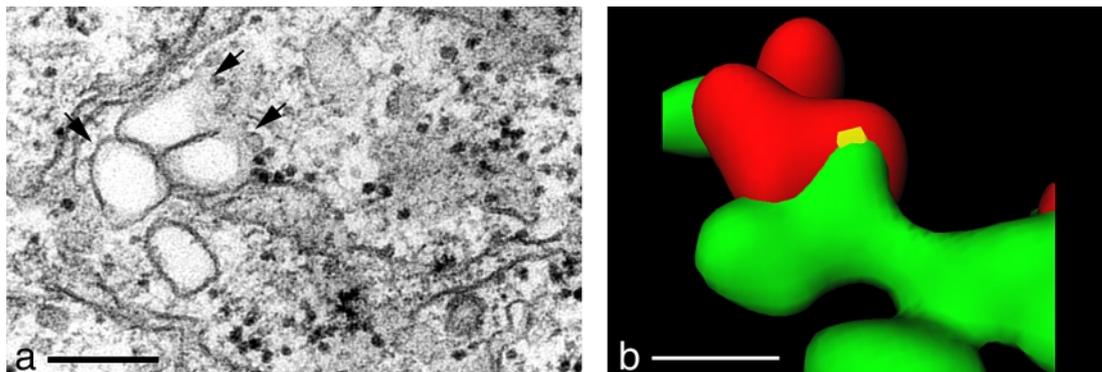


Abb. 32: Vergleich der Darstellung der Poliovirus-Vesikel im Elektronenmikroskop und der 3D-Rekonstruktion von CLSM-Bildserien. Ausschnitte aus mit PV-Sabin1 infizierten BT7-H Zellen 3.30 hpi, die für die Elektronenmikroskopie (a) oder die Immunfluoreszenz (b) mit den Markern p63 (grün) und 2B (rot) prozessiert wurden. Ein Cluster aus drei zusammenliegenden Vesikeln kann in der 3D-Rekonstruktion nicht vollständig aufgelöst werden, aber anhand der Oberflächen kann die Anzahl und das Arrangement der einzelnen Vesikel des Clusters bestimmt werden. In der Elektronenmikroskopie ist die Auflösung höher, jedoch auf zwei Dimensionen beschränkt (a). Maßstäbe: 200 nm (a); 200 nm (b).

In der 3D-Rekonstruktion der CLSM-Bilder (Abb. 32 b) war ein ähnliches Cluster aus vier Vesikeln zu erkennen (markiert durch 2B, rot), die in engem Kontakt mit den ER-Membranen standen (p63, grün). Die drei Vesikel im Zentrum der Abbildung konnten aufgrund ihrer eng verbundenen Membranen durch diese Methode nicht mehr getrennt dargestellt werden, jedoch ist an der Basis der vorderen Vesikels ein Bereich zu erkennen, in dem der ER-Markern p63 mit dem viralen Vesikelmarker 2B kolokalisiert (gelb). Ein viertes Vesikel befand sich hinter diesen drei Vesikeln

und war deutlicher von diesen abgegrenzt. Die Größe der Vesikel war in der elektronenoptischen Darstellung und in der 3D-Rekonstruktion der CLSM-Bilder mit einem Durchmesser von ca. 150 bis 300 nm gleich. Obwohl die drei beieinanderliegenden Poliovirus-Vesikel durch die Lichtmikroskopie auch nach der 3D-Rekonstruktion nicht getrennt dargestellt werden konnten, war doch die Beurteilung der Anzahl der Vesikel pro Cluster durch die abgebildete Oberfläche der Strukturen im Isosurface möglich.

Die verwendete Methode der 3D-Rekonstruktion konnte also bei der Detektion kleiner Strukturen, wie der Poliovirus-Vesikel, durch die Elektronenmikroskopie validiert werden.

3.8. Darstellung der Poliovirus-Vesikel und des Golgi-Apparates durch konfokale Mikroskopie, Dekonvolution und 3D-Rekonstruktion

Um die Präsenz von Golgi-Markern an den Membranen der Poliovirus-Vesikel zu testen, wurde ein monoklonaler Antikörper gegen das Golgi-Protein Giantin in der Immunfluoreszenz eingesetzt. Giantin ist ein Transmembranprotein, das ausschließlich in den Membranen des cis- und mittleren Golgi-Apparates vorkommt, also dort, wo die Bildung retrograder Transportvesikel überwiegend stattfindet (Klumperman, 2000). Abbildung 33 (a und b) zeigt die Aufnahme einer Poliovirus-infizierten Zelle 3.30 hpi im konventionellen Fluoreszenzmikroskop, die mit dem direkt an FITC gekoppelten Antikörper gegen PV-2B (a) und mit dem Antikörper gegen Giantin (b) markiert war. Da für beide Marker ausschließlich monoklonale Maus-Antikörper zur Verfügung standen, wurde die Immunreaktion nach einem besonderen Schema durchgeführt, das im Teil Material und Methoden erläutert ist. Die abgebildete Zelle zeigte eine fortgeschrittene Vesikelbildung, wie die große Zahl der 2B-positiven Strukturen im Cytoplasma verdeutlichte. Trotz der fortgeschrittenen Vesikelbildung fand sich keine Übereinstimmung beider Marker in deren Verteilung in der Zelle. Die PV-Vesikel sind im Bereich des Golgi nicht stärker konzentriert als in anderen Bereichen der Zelle, es finden sich im Gegenteil sogar in Teilbereichen des Golgi-Apparates weniger Vesikel als in den perinukleären Teilen des Cytoplasma, wo keine Golgi-Markierung detektierbar war. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden von den oben beschriebenen Präparaten Bildstapel im CLSM aufgenommen und dekonvolviert. In Abbildung 33c ist ein MIP eines solchen Bildstapels dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, daß nur sehr wenig Signal beider Marker zusammen vorkommt, also Kollokalisierung (gelb) zeigt. Diese Bereiche der Kollokalisierung von 2B und Giantin sind weitaus seltener als die Kollokalisierung zwischen den ER-Membranmarkern und dem PV-Vesikelmarker. Dazu kommt, daß für die Aufnahmen im CLSM, Bereiche ausgewählt wurden, in denen beide Marker vorkamen, also Golgi-Apparat und PV-Vesikel vertreten waren. Das meiste 2B-Signal kam früh in der Infektion hingegen in Bereichen des Cytoplasma vor, in denen der Golgi nicht lokalisiert war. Wie ebenfalls in den Abbildungen 33a und b zu sehen ist, ist die Lokalisation des Golgi-Apparats meist auf das Cytoplasma an einer Seite des Nukleus beschränkt, während das erste 2B-Signal an anderen Stellen eher verteilt im Cytoplasma

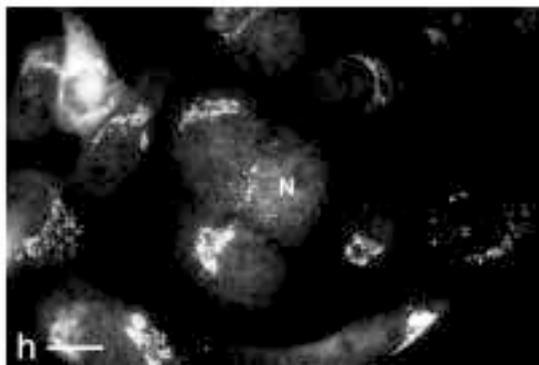
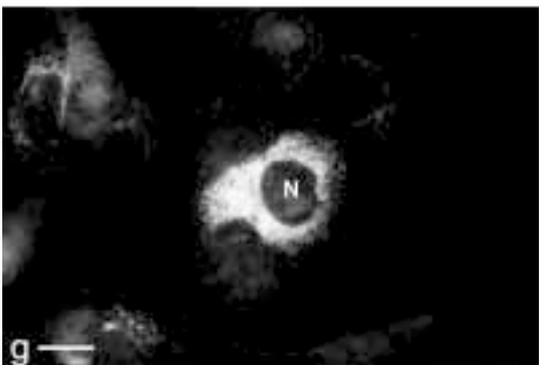
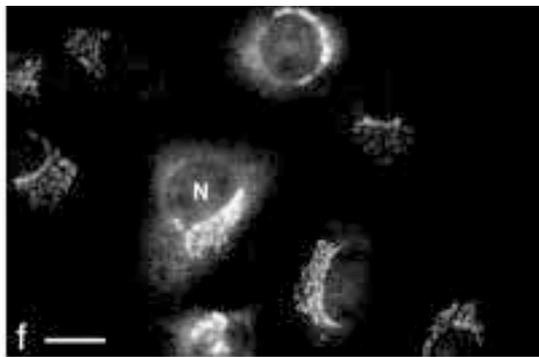
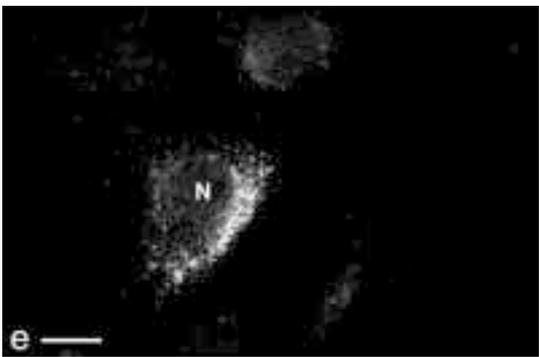
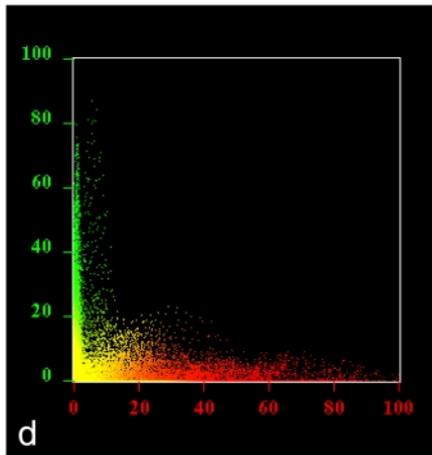
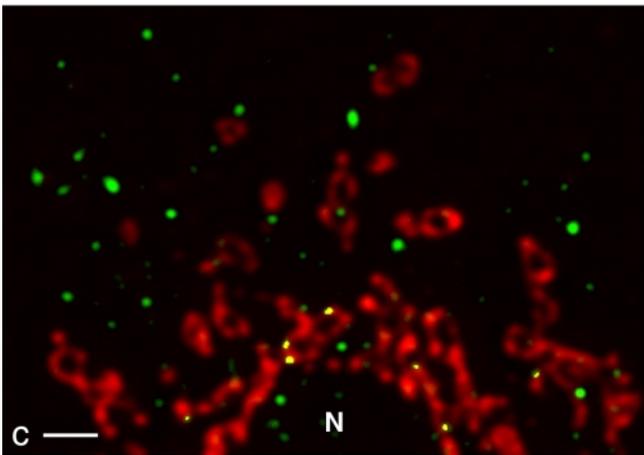
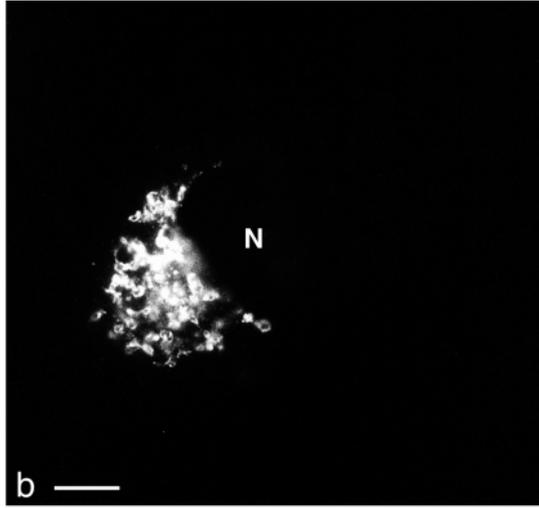
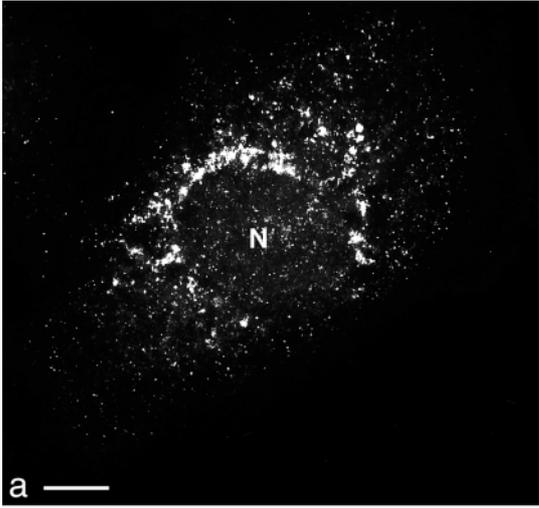


Abb. 33

auftritt, was gegen die Herkunft der PV-Vesikel vom Golgi-Apparat zu frühen Zeiten der Infektion spricht. Die Seltenheit der Kolo-kalisation zwischen Giantin- und 2B-Signal führte zu der Annahme, daß es sich hierbei wahrscheinlich um eine zufällige Kolo-kalisation ohne biologische Relevanz handelte.

Die gleichen Versuche wurde ebenfalls mit einem weiteren Marker für die Membranen des Golgi-Apparates durchgeführt. Dabei handelte es sich um einen monoklonalen Antikörper gegen das Transmembranprotein GP130, das im cis-Golgi und im mittleren Golgi-Apparat lokalisiert ist. Die Versuche mit GP130 (nicht gezeigt) führten zu den gleichen Ergebnissen, wie die mit Giantin, also nur in seltenen Fällen zu einer Kolo-kalisation des Golgi-Markers GP130 mit dem Marker der Poliovirus-Vesikel 2B. Damit konnten die oben beschriebenen Ergebnisse für den Golgi-Apparat mit einem weiteren, für die Membranen des cis- und mittleren Golgi definierten Marker bestätigt werden.

Versuche zu Beginn dieser Arbeit, die ebenfalls die Frage des Golgi-Apparates als möglichen Ursprung der Poliovirus-Vesikel beantworten sollten, wurden mit einem Antikörper gegen den Golgi-Marker p58K (oder gp58, Saraste et al., 1987) durchgeführt. Diese Versuche zeigten im konventionellen Fluoreszenzmikroskop (Abb. 33e bis h), daß selbst in den späteren Phasen der Infektion (hier: 4.30 hpi) die Bereiche, die durch den anti 2B-Antikörper markiert wurden (Abb. 3 e), keine oder nur eine sehr schwache Markierung mit dem Antikörper gegen das Protein p58K zeigten (Abb. 33f). Bei noch stärkerer Expression des 2B in den infizierten Zellen war bei diesen Versuchen weiterhin die bereits für die späten Phasen der Poliovirus-Infektion beschriebene Desintegration des Golgi-Apparates (Bienz et al., 1973; Sandoval und Carrasco, 1997) zu sehen (Abb. 33g und h). Allerdings wurde der Antikörper gegen diesen Golgi-Marker nicht in den weiteren Versuchen im CLSM eingesetzt, da es sich bei p58K zwar um ein mit Membranen assoziiertes Protein handelt, aber die Lokalisierung des p58K-Proteins in der Literatur nicht zweifelsfrei geklärt werden konnte. So wurde p58K zunächst nur in den Bereichen des Zisternen des cis-Golgi gefunden (Saraste et al., 1987), später aber auch in Transportintermediaten zwischen dem Golgi-Apparat und dem ER nachgewiesen (Saraste et al., 1991; Lahtinen et al., 1992; Plutner et al., 1992).

Abb. 33: Der Golgi-Apparat ist nicht der primäre Entstehungsort der Poliovirus-Vesikel. Poliovirus-infizierte BT7-H Zellen wurden 3.30 hpi fixiert und mit dem Antikörper gegen Giantin und dem Konjugat Cy3 (b, rot in c und d) sowie mit einem direkt gekoppelten 2B-FITC Antikörper und einem anti FITC-Alexa 488 Konjugat (a, grün in c und d) markiert. Die Untersuchung im konventionellen Fluoreszenzmikroskop zeigt eine unterschiedliche Verteilung beider Signale in der gesamten Zelle (a und b). Die Signale beider Marker zeigen in der konfokalen Mikroskopie nur sehr wenig Kolo-kalisation (c), was durch die Verteilung der Fluoreszenzintensitäten im korrespondierenden Histogramm bestätigt wird (d). Auch die Markierung von 2B und dem Golgi-Marker p58K zeigte, daß sich beide Signale weitgehend ausschließen (e und f). Der Golgi-Apparat dissoziiert in den späteren Phasen der Infektion (g und h). Maßstäbe: 10 µm (a und b), 2 µm (c), 20 µm (e bis f), N = Nukleus.

Mit Hilfe der verschiedenen Darstellungsformen konnten die folgenden Aussagen über die Bildung der Poliovirus-Vesikel erzielt werden: Die Poliovirus-Vesikel stehen in Kontakt mit den Membranen des ER, aber nicht mit den Membranen des cis- und mittleren Golgi. An den Membranen der Poliovirus-Vesikel befinden sich keine der getesteten ER-Membranmarker. Die Kolo­kalisierung der ER-Membranmarker und dem Marker für die Poliovirus-Vesikel ist auf zwei verschiedene Strukturen beschränkt. Erstens zeigen die Übergangsbereiche zwischen den Membranen des ER und der PV-Vesikel eine Kolo­kalisierung der Marker und zweitens kommt Kolo­kalisierung auf den Membranen des ER in örtlich begrenzten Bereichen vor, an denen keine Vesikel gefunden wurden.

3.9. Untersuchung anterograder Transportvesikel in uninfizierten und Poliovirus-infizierten Zellen

Durch die zuvor beschriebenen Ergebnisse konnten noch keine Aussagen über den Ursprung der Poliovirus-Vesikel und über die Mechanismen ihrer Entstehung gemacht werden, da die mikroskopischen Bilder Momentaufnahmen darstellten und daher nicht belegen konnten, ob die Vesikel, die an den Membranen des ER lokalisiert waren, während des Absprossens vom ER oder während der Fusion mit dem ER abgebildet wurden. Besonders da sich an den Membranen der Poliovirus-Vesikel keine ER-Membranproteine befanden, konnte nichts darüber ausgesagt werden, ob diese während der Vesikelentstehung am ER nicht in die Vesikelmembranen übernommen wurden, oder ob die Poliovirus-Vesikel an einem anderen Organell gebildet wurden und daher diese Markerproteine nicht trugen. Um diese Fragen zu beantworten, wurde nach weiteren Proteinen gesucht, die sich auf den Membranen der Poliovirus-Vesikel befanden und einen Hinweis auf der Ursprung der Vesikel geben könnten. Dabei wurde besonders nach Proteinen der zellulären Transportvesikel gesucht, da diese charakteristisch für den Bildungsort und den Transportweg zellulärer Vesikel sind. Würden sich Bestandteile dieser charakteristischen Proteinkomplexe auf den Poliovirus-Vesikeln finden, wäre das ein deutlicher Hinweis auf den Ursprung dieser Vesikel in der Infektion.

Darstellung anterograder Transportvesikel in uninfizierten Zellen

Zunächst wurden das Erscheinungsbild und die Charakteristika der anterograden Transportvesikel in uninfizierten Zellen mit der für die Poliovirus-Infektion eingesetzten Methode der dreidimensionalen konfokalen Mikroskopie untersucht. Zur Darstellung der anterograden Transportvesikel und der Membranen des ER durch p63, wurden uninfizierte BT7-H Zellen aus einer eintägigen Monolayer-Kultur für die Immunfluoreszenz fixiert und mit Antikörpern gegen die COPII-Bestandteile Sec13 bzw. Sec31 und gegen den ER-Membranmarker p63 markiert. Auf den MIPs einer mit anti Sec31 und anti p63 markierten uninfizierten Zelle in Abbildung 34a wurden die Membranen des ER in grün, sowie die anterograden Transportvesikel markiert mit Sec31 in rot

dargestellt. Nach der 3D-Rekonstruktion erschien die Mehrzahl der anterograden Transportvesikel in Kontakt mit den Membranen des ER, nur einige wenige Vesikel waren nicht am ER gebunden (Abb. 34b). Die Kolokalisation (gelb) fand sich in diesen uninfizierten Zellen in charakteristischen Bereichen, wie offenen und geschlossenen Ringen bzw. halbmondförmigen Strukturen wieder, die oft ein reines COPII Signal von vesikulärer Morphologie umgaben. Da die COPII-Vesikel

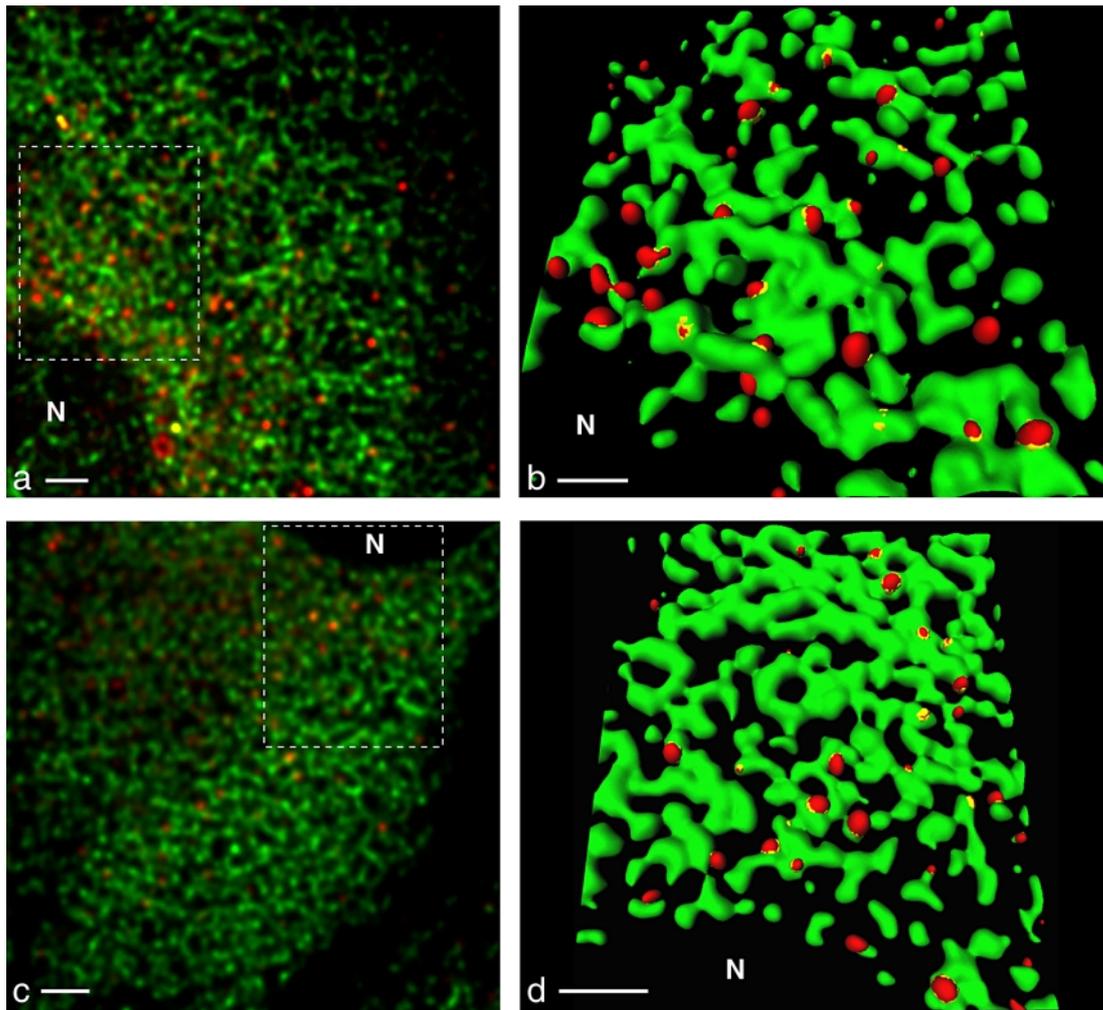


Abb. 34: Der ER-Membranmarker p63 wird aus den Membranen der anterograden Transportvesikel in uninfizierten und in Poliovirus-infizierten Zellen ausgeschlossen. Uninfizierte BT7-H Zellen (a und b) oder BT7-H Zellen 3.30 h nach der Infektion mit PV Sabin1 (c und d) wurden für die Immunfluoreszenz fixiert und mit den Markern gegen Sec31 (rot) und p63 (grün) markiert. Die markierten Ausschnitte in den MIPs in a und c wurden als 3D-Rekonstruktionen dargestellt (b und d). Sowohl in der uninfizierten als auch in der PV-infizierten Zelle werden die ER-Marker aus den anterograden Transportvesikeln ausgeschlossen. Die Morphologie der anterograden Vesikel in der 3D-Rekonstruktion unterscheidet sich in uninfizierten und PV-infizierten Zellen nicht. Maßstäbe: 2 μm (a), 1 μm (b), 2 μm (c), 2 μm (d), N = Nukleus.

ausschließlich an den Membranen des ER gebildet werden, kann aus den gezeigten Bildern geschlossen werden, daß die Vesikel, die in Kontakt mit dem ER waren, gerade dabei waren, von diesem abzusprossen. Während der Bildung der anterograden Transportvesikel werden ER-Membranproteine ausgeschlossen, wie die auf die Basis der Vesikel beschränkte Kolo-kalisation zwischen Sec31 und p63 zeigte. Diese Beobachtung war in Übereinstimmung mit den bisher publizierten Ergebnissen für das Protein p63 (Schweizer et al., 1995) und zeigte, daß auch bei der hohen Auflösung der verwendeten Methode der konfokalen Mikroskopie keine Artefakte auftraten. Die gleichen Ergebnisse konnten ebenfalls für den zweiten ER-Marker MERG erzielt werden (nicht gezeigt). Die Morphologie der anterograden Transportvesikel in den uninfizierten Zellen erschien den Poliovirus-Vesikeln sehr ähnlich, die mit der gleichen Methode in infizierten Zellen nachgewiesen werden konnten.

Darstellung anterograder Transportvesikel in Poliovirus-infizierten Zellen

Da die Morphologie der anterograden Transportvesikel in uninfizierten Zellen den Poliovirus-Vesikeln sehr ähnlich war, wurde untersucht, ob sich die Bildung der anterograden Transportvesikel in uninfizierten Zellen und in Poliovirus infizierten Zellen unterscheidet. Dazu wurden BT7-H Zellen mit PV Sabin1 infiziert und 3.30 h nach der Infektion für die Immunfluoreszenz fixiert. Nach der Detektion des ER-Membranmarkers p63 und des COPII-Markers Sec31, wurden die Bildstapel dekonvoluiert und 3D-Rekonstruktionen von diesen erstellt. Poliovirus-infizierte Zellen wurden im CLSM von uninfizierten Zellen durch die beginnende Texturänderung des durch den anti p63 Antikörper markierten ER (siehe Kapitel 3.6.) unterschieden. Die Abbildungen 34c und d zeigen das MIP und die 3D-Rekonstruktion einer Poliovirus-infizierten BT7-H Zelle, in der anterograde Transportvesikel (rot) und die Membranen des ER (grün) markiert wurden. Die anterograden Transportvesikel trugen auch nach der Poliovirus-Infektion - wie in den uninfizierten Zellen - keine der getesteten ER-Membranproteine und die Kolo-kalisation der ER- und COPII-Vesikel-Marker war beschränkt auf die schmalen Bereiche an der Basis der Vesikel bzw. ihrem Übergang zu den Membranen des ER. Die Mehrzahl der beobachteten Vesikel, die COPII-Marker trugen, war an den Membranen des ER lokalisiert. Auch nach der Infektion unterschieden sich also die anterograden Transportvesikel nicht von denen der uninfizierten Zellen. Im Gegensatz zu den uninfizierten Zellen fiel jedoch auf, daß der Anteil der COPII-markierten Vesikel, die nicht in Kontakt mit dem ER standen, in den infizierten Zellen höher war (nicht gezeigt).

Untersuchung der Kolo-kalisation der COPII-Bestandteile Sec13 und Sec31 in uninfizierten Zellen

Durch Rekonstitutionsexperimente zur Bildung anterograder Transportvesikel konnte die strikt sequentielle Bindung der einzelnen Bestandteile des COPII-Coat gezeigt werden (Matsuoka et al., 1998). Diese führt dazu, daß die jeweils nächsten Proteine des COPII-Coat ausschließlich

rekrutiert werden können, wenn die vorherigen Proteine dieser Kaskade bereits an den Membranen der ERES gebunden sind. Da der Sec13/31-Komplex der letzte vor dem Abschnüren der Vesikel an die Membranen rekrutierte Komplex ist, kann dieser nur dann an den Vesikeln detektiert werden, wenn alle vorherigen Bestandteile des COPII-Coat dort schon vorhanden und funktionell sind (siehe Kapitel 1.6. Anterograde Transport).

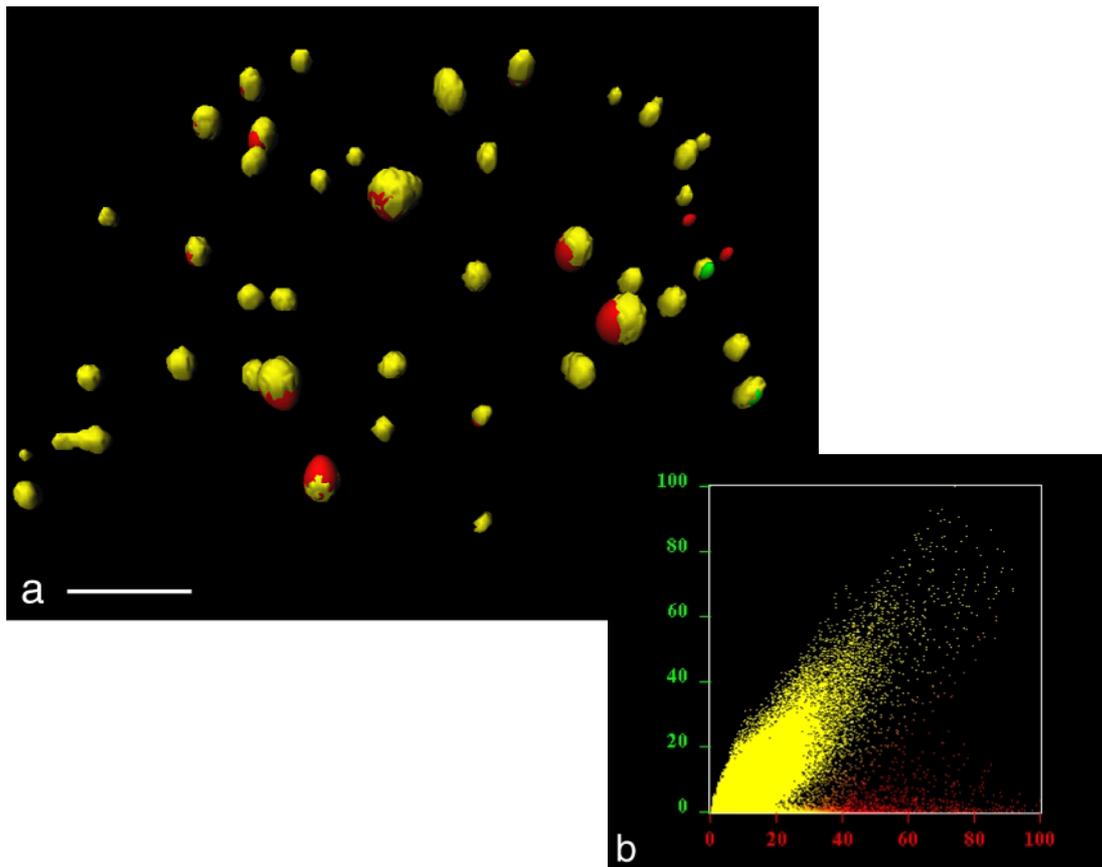


Abb. 35: Die COPII-Bestandteile Sec13 und Sec31 kolokalisieren auf den Vesikeln des anterograden Transports. Uninfizierte BT7-H Zellen wurden nach der Fixierung mit Antikörpern gegen Sec13 (Konjugat GAM-Cy3, rot) und Sec31 (Konjugat GAR-Cy2, grün) behandelt. Nach der Definition der Kolokalisation ist in der 3D-Rekonstruktion zu erkennen, daß beide Marker fast vollständig auf vesikulären Strukturen kolokalisieren (a). Das korrespondierende Histogramm bestätigt diese deutliche Kolokalisation beider Marker (b). Maßstab: 1 μm (a).

Um die Präsenz des funktionellen COPII-Coats auf den Membranen der anterograden Transportvesikel in BT7-H Zellen mit der konfokalen Mikroskopie zu zeigen, wurden uninfizierte Zellen als eintägige Monolayer-Kultur bis zu 80% Konfluenz angesetzt und für die

Immunfluoreszenz fixiert. Die fixierten Zellen wurden mit Antikörpern gegen Sec13 und Sec31 und den Konjugaten GAM-Cy3 bzw. GAR-Cy2 markiert. In Abbildung 35a, dem Isosurface eines Teils einer BT7-H Zelle, die für Sec13 (rot) und für Sec31 (grün) markiert wurde, zeigen beide Marker ein hohes Maß an Kollokalisierung (gelb), die ausschließlich in vesikulären Strukturen vorkam. Diese vesikulären Strukturen stellten entsprechend der Literaturangaben für den COPII-Coat (Matsuoka et al., 1998; Hong, 1998) und den zuvor erzielten Ergebnissen dieser Arbeit (siehe vorheriges Kapitel) die am ER gebildeten COPII-Vesikel dar. Das korrespondierende Histogramm dieses Bildstapels in Abbildung 35b bestätigt die deutliche Kollokalisierung der beiden COPII-Bestandteile. Beide detektierten Proteine befanden sich also auf den Membranen der gleichen anterograden Transportvesikel. Aufgrund der beschriebenen sequentiellen Bindung aller COPII-Proteine kann auf die Anwesenheit eines vollständigen und funktionellen COPII-Coats auf den dargestellten Vesikeln geschlossen werden, wenn beide verwendeten Marker, Sec13 und Sec31 auf den Vesikeln vorhanden sind. Dies trifft auch zu, wenn nur einer dieser Marker dort detektiert wurde, da die Bindung dieser beiden Proteine als im Cytoplasma vorgeformter Dimer-Komplex nur stattfindet, wenn die vorherigen Proteine des COPII-Coat schon an den Membranen der ERES gebunden sind (Matsuoka et al., 1998; Antony et al., 2001).

Der Durchmesser der für beide Marker positiven vesikulären Strukturen lag auch nach der Berechnung in den einzelnen Z-Schnitten der Bildstapel in allen Fällen zwischen 100 nm und 300 nm.

3.10. Untersuchung der Kollokalisierung von COPII-Bestandteilen mit dem Marker für die Poliovirus-Vesikel in infizierten Zellen

Die Morphologie und das Erscheinungsbild der anterograden Transportvesikel unterschied sich in den uninfizierten Zellen nicht von denen der Poliovirus-infizierten Zellen und waren ebenfalls den Poliovirus-Vesikeln früh in der Infektion sehr ähnlich. Daher stellte sich die Frage, ob es sich bei den beobachteten Vesikeln um zwei getrennte Populationen handelte, oder ob die Poliovirus-Vesikel ebenfalls die Marker des COPII-Coat trugen. Dies würde auf einen homologen Bildungsmechanismus der anterograden Transportvesikel und der Poliovirus-Vesikel hindeuten. Um diese Frage zu beantworten, wurden BT7-H Zellen mit Poliovirus Sabin1 infiziert und 3.30 h nach der Infektion für die Immunfluoreszenz fixiert. Nach der Immunfluoreszenz mit den Antikörpern gegen PV-2B und gegen Sec13 wurden Bildstapel der Präparate im CLSM aufgenommen und dekonvoluiert.

Abbildung 36a zeigt das MIP des Ausschnitts einer Zelle markiert mit den Antikörpern gegen Sec13 und GAR-Cy2 (grün) bzw. gegen 2B und GAM-Cy3 (rot). Es ist zu erkennen, daß beide Marker in hohem Maße kollokalisieren (gelb), also nach der Infektion einer Zelle mit Poliovirus die viralen 2B-enthaltenen Proteine überwiegend in Strukturen vorkamen, die auch die COPII-Marker trugen. Besonders in der korrespondierenden 3D-Rekonstruktion eines Ausschnitts dieses

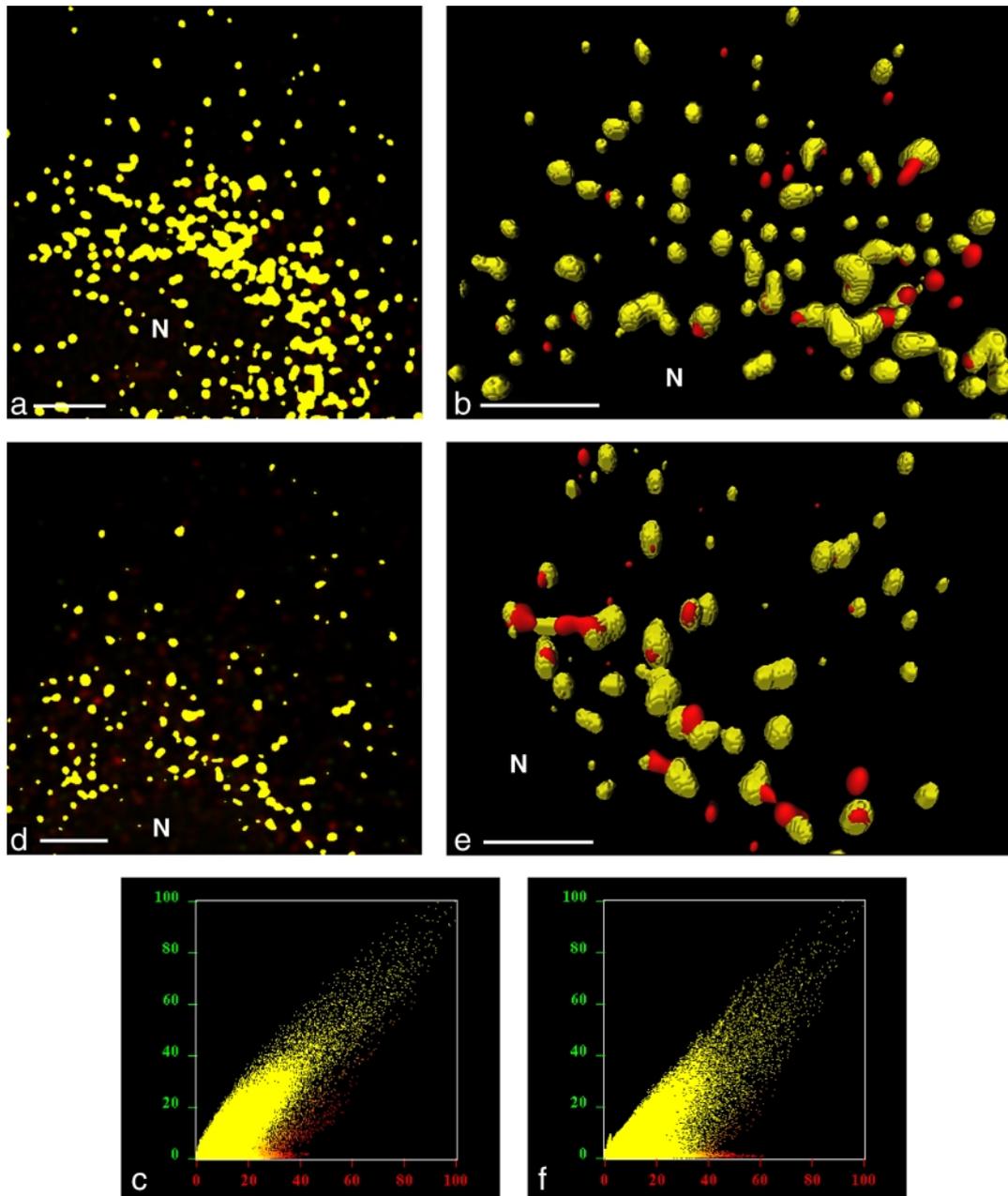


Abb. 36: Poliovirus-Vesikel tragen beide COPII-Bestandteile Sec13 und Sec31. PV-infizierte BT7-H Zellen wurden 3.30 hpi nach der Infektion fixiert und mit den Markern gegen PV-2B (rot, a bis f), sowie gegen Sec13 (grün, a, b, c) oder Sec31 (grün, d, e, f) markiert. Der Marker 2B zeigt eine starke Kolokalisation (gelb) mit beiden Bestandteilen des COPII-Coat, durch die 3D-Rekonstruktion konnte gezeigt werden, daß es sich dabei um Poliovirus-Vesikel handelt (b und e). Es sind nach der Infektion keine Strukturen in der Zelle zu detektieren, die ausschließlich die COPII-Marker (grünes Signal) enthalten, wie beide Histogramme (c und f) bestätigen. Dagegen kommen wenige tubuläre Strukturen vor, die ausschließlich den viralen 2B-Marker tragen. Maßstäbe: 2 μ m (a, b, d und e), N = Nucleus.

Bildstapels (Abb. 36b) war zu erkennen, daß die Kolokalisation beider Marker überwiegend in vesikulären Strukturen vorkam, die im Cytoplasma der Zelle verteilt vorlagen, aber im perinukleären Bereich der Zelle höher konzentriert waren und dort Cluster bildeten. Zusätzlich zu den kolokalisierenden Signalen kamen noch einige wenige Bereiche vor, die ausschließlich das rote Signal des 2B-Markers trugen. Diese Strukturen waren jedoch meist in direktem Kontakt mit den Bereichen in denen die Kolokalisation vorkam und hatten vesikuläre und tubuläre Morphologie. Im Gegensatz dazu kamen nach der Infektion mit Poliovirus keine Strukturen mehr in der Zelle vor, die ausschließlich das grüne Signal des Sec13-Markers trugen (Abb. 36a und b).

In dem zu diesem Bildstapel korrespondierenden Histogramm wird der hohe Grad der Kolokalisation beider Marker durch die Voxel-Population im Bereich der 45 Grad-Achse der Koordinatensystems gezeigt (fingerförmige Verteilung der Voxel in Abbildung 36c). Weiterhin bestätigt sich in dieser Darstellung, daß kein Sec13-Signal in der infizierten Zelle vorkommt ohne mit dem viralen Protein 2BC bzw. 2B assoziiert zu sein. Die Population des 2B-Signals, das nicht mit dem Sec13-Signal assoziiert ist, besteht nur aus einer kleinen Zahl an Voxeln entlang der X-Achse des Histogramms.

Aus diesen Ergebnissen wird klar, daß schon zu frühen Zeitpunkten der Infektion mit Poliovirus alle zellulären, COPII-tragenden Vesikel ebenfalls PV-2B Proteine tragen. Dies legt nahe, daß die Poliovirus-Vesikel und die zellulären Vesikel des anterograden Transport durch homologe Mechanismen mittels des zellulären COPII-Coat gebildet werden.

Um zu überprüfen, ob der COPII-Coat vollständig und funktionell auf den Membranen der Poliovirus-Vesikel vorhanden ist und nicht nur das Sec13-Protein, wurde eine zweite Serie Immunfluoreszenzen mit dem Antikörper gegen PV-2B (mit dem Konjugat GAM-Cy3, rot) und gegen den zweiten Bestandteil des Sec13-Komplexes, Sec31 (mit dem Konjugat GAR-Cy2, grün) durchgeführt. Abbildung 36d zeigt ein MIP einer solchen Bildserie und die Abbildung 36e die korrespondierende 3D-Rekonstruktion eines Ausschnitts der Abbildung 36d. Auch hier ist deutlich zu erkennen, daß auch der zweite Marker des COPII-Coat, das Sec31-Protein, mit dem Signal des PV-Vesikelmarker 2B kolokalisiert. Es wurden, wie bei der Markierung des Sec13, nur wenige Strukturen detektiert, die ausschließlich 2B-Signal trugen. Ebenfalls wurde kein freies Sec31-Signal, also keine COPII-Vesikel ohne virales 2B-Protein gefunden, was durch das korrespondierende Histogramm in Abbildung 36f bestätigt wurde.

Durch die sequentielle Bindung aller Bestandteile des COPII-Coat können die Proteine Sec13 und Sec31 nur an die ER-Membranen binden und das Absprossen der Vesikel induzieren, wenn alle vorherigen Proteine des COPII-Coat dort bereits gebunden haben. Diese Ergebnisse sprechen für eine Bildung der Poliovirus-Vesikel durch den zellulären COPII-Mechanismus, da beide getesteten Proteine des COPII-Coat auf den Poliovirus-Vesikeln detektiert wurden.

3.11. Vergleich der Verteilung der anterograden Transportvesikel in uninfizierten Zellen mit der Verteilung der Poliovirus-Vesikel in infizierten Zellen

Da nach der Infektion mit Poliovirus die viralen Vesikel im Cytoplasma der Zelle in Clustern zusammenlagern und zunehmend akkumulierten, stellte sich die Frage, ob dieses Phänomen schon früh in der Infektion an den Bildungsorten der Vesikel auftritt und ob sich die Verteilung der Poliovirus-Vesikel schon zu diesem frühen Zeitpunkt von den anterograden Transportvesikeln unterscheidet. Um diese Frage zu beantworten, wurden Immunfluoreszenzanalysen in uninfizierten und Poliovirus-infizierten BT7-H Zellen durchgeführt, bei denen die Kollokalisierung des 2B-Markers mit dem COPII-Marker Sec13 bzw. die Kollokalisierung der beiden COPII-Marker Sec13 und Sec31 bestimmt wurde. Von den erhaltenen MIPs wurden schwarz/weiß Bilder mit hohem Kontrast erstellt, die eine Darstellung der Verteilung der Vesikel im Cytoplasma der Zellen ermöglichten. In Abbildung 37a ist ein Ausschnitt einer Poliovirus-infizierten Zelle (3.30 hpi) dargestellt. Dadurch, daß die Poliovirus-Vesikel besonders im perinukleären Bereich des Cytoplasmas eng miteinander assoziiert waren, konnten die größeren Strukturen in diesen Bildern nicht mehr als einzelne Vesikel dargestellt werden. In der Peripherie des Cytoplasmas waren vereinzelte Vesikel zu sehen, die keine Cluster bildeten. In den uninfizierten Zellen (Abb. 37b), bildeten die COPII-Vesikel keine

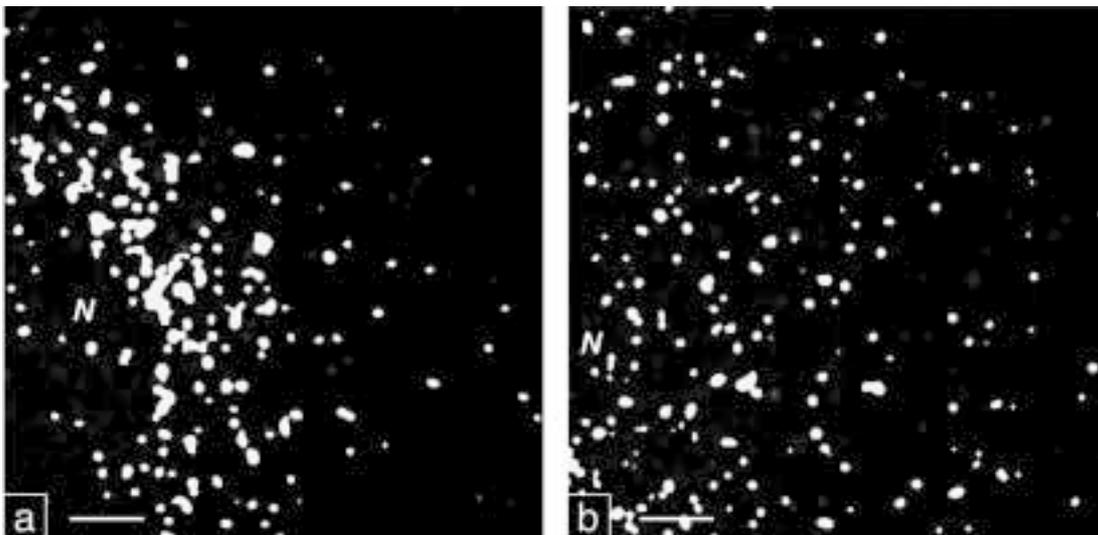


Abb. 37: Poliovirus-Vesikel sind bereits früh in der Infektion in Clustern lokalisiert. Von Poliovirus-infizierten (3.30 hpi, a) und uninfizierten (b) BT7-H Zellen wurden nach der Markierung mit 2B und Sec13 (a) sowie Sec13 und Sec31 (b), Bildserien im CLSM aufgenommen, dekonvolviert und die Kollokalisierung beider Marker bestimmt. Die erhaltenen MIPs wurden als schwarz/weiß Bilder mit hohem Kontrast abgebildet und zeigen die Verteilung der Poliovirus-Vesikel (a) und der anterograden Transportvesikel (b). Während die anterograden Transportvesikel eher gleichmäßig über das Cytoplasma der Zelle verteilt sind und einzeln vorkommen, sind die Poliovirus-Vesikel in der perinukleären Region angereichert und bilden Cluster. Maßstab: 2 μ m (a), N = Nukleus.

Ansammlungen, auch nicht in der Nähe des Zellkerns, sondern kamen ausschließlich einzeln im Cytoplasma vor. Die anterograden Transportvesikel waren im Gegensatz zu den infizierten Zellen homogen über das gesamte Cytoplasma der Zellen verteilt.

Die Poliovirus-Vesikel zeigten bald nach ihrer Bildung, also schon früh in der Infektion die Tendenz, an ihrem Entstehungsort zu akkumulieren. Die zellulären COPII-Vesikel wurden ebenso verteilt über die ganze Zelle, also auch in deren Peripherie, gebildet, zeigten jedoch keine Akkumulation in Form von Clusters im Cytoplasma.

3.12. Untersuchung der Poliovirus-Vesikel nach Expression aller Poliovirus-Nichtstrukturproteine in BT7-H Zellen

Die Poliovirus-Vesikel stellen - wie in der Einleitung beschrieben - die strukturelle Voraussetzung für den Aufbau des viralen Replikationskomplex dar, in dem die Vermehrung der viralen RNA stattfindet. Nachdem aus den vorherigen Untersuchungen hervorgegangen war, daß die Poliovirus-Vesikel durch den zellulären COPII-Mechanismus gebildet werden, stellte sich die Frage, ob dieser Mechanismus auch ohne die virale RNA-Replikation bei der Expression aller Nichtstrukturproteine des Poliovirus zur Produktion von Poliovirus-Vesikeln benutzt würde. Um diese Frage zu beantworten, wurden BT7-H Zellen durch Lipofectin mit dem Plasmid pE5-PV Δ P1 (kurz: „pE5“) transfiziert (Cho et al., 1994), das alle viralen Nichtstrukturproteine der P2 und P3-Regionen unter der Kontrolle des T7-Promotors enthält. Durch die T7-Polymerase konnte eine mRNA vom Plasmid pE5 transkribiert werden, von der die Proteine durch den zellulären Translationsapparat erstellt wurden. Daher konnten die P2- und P3-Proteine direkt in BT7-H Zellen exprimiert werden. Bei dem Konstrukt pE5 wurde im Bereich der Poliovirus-Sequenz das IRES-Element gegen die IRES des Encephalomyocarditis-Virus ausgetauscht, das eine höhere Effizienz der Translationsinitiation hat (Teterina et al., 2001). Außerdem wurde von der Poliovirus-Sequenz das „Clover-leaf“ am 5'-Ende entfernt, wodurch keine Replikation der viralen RNA mehr stattfinden konnte (Teterina et al., 2001). Bei der Transfektion des pE5 wurde eine Effizienz von 15 bis 20% in der Zellkultur erreicht, die durch die Detektion des viralen Proteins 2B in der Immunfluoreszenz bestimmt werden konnte. In Abbildung 38 sind Bilder einer mit pE5 transfizierten BT7-H Zelle 8 h nach der Transfektion gezeigt. Auffallend war bei der Expression aller Nicht-Strukturproteine, daß bis zu einem Zeitpunkt von ca. 7 h nach der Transfektion wenig bis keine viralen Proteine im Cytoplasma gefunden wurden, danach aber in einer kurzen Zeit eine schnelle Zunahme der Proteinmenge in der Zelle zu detektieren war (nicht gezeigt). Dabei war in Teilen des perinukleären Bereichs einiger transfizierter Zellen eine starke Ansammlung des 2B-Signals zu erkennen. Diese lokal begrenzte Überexpression des transfizierten Konstrukts war bei der Lipofectin-Transfektion in diesem System häufig zu beobachten. Für die Bestimmung des Ursprungs der PV-Vesikel in den ersten Phasen ihrer

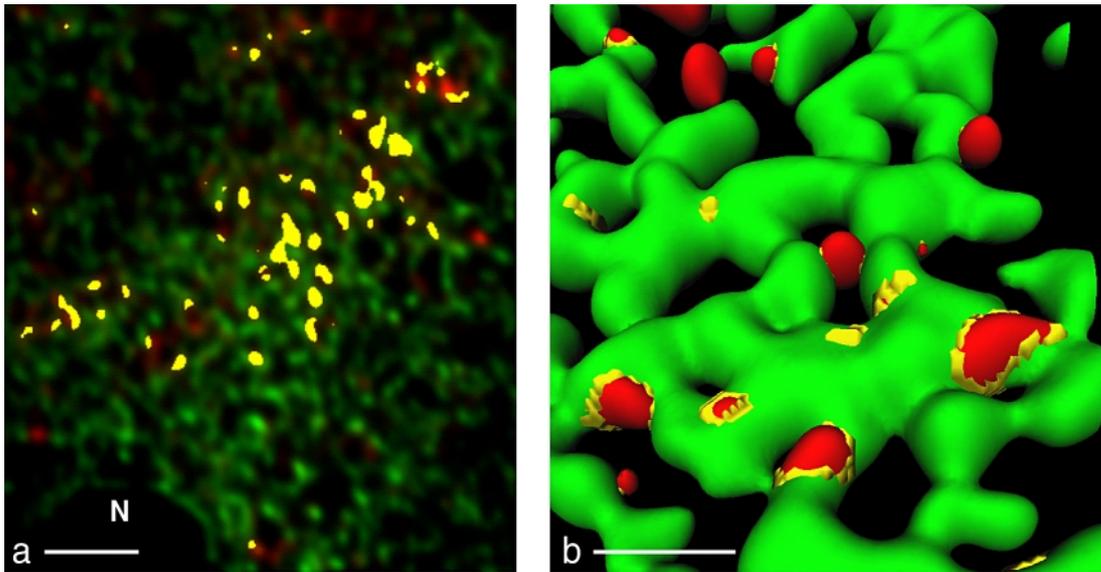


Abb. 38: Virale Replikation ist keine Voraussetzung für die Bildung der Poliovirus-Vesikel. BT7-H Zellen wurden mit dem Plasmid pE5-PV Δ P1 transfiziert, das für alle viralen Nicht Strukturproteine codiert, dessen RNA aber nicht replizieren kann. Nach der Fixierung 8 h nach der Transfektion und der Markierung der Zellen mit den Antikörpern gegen PV-2B (rot) und p63 (grün), wurden Bildserien davon aufgenommen, diese dekonvoluiert und nach der Definition der Kolo-kalisation als MIP (a) und 3D-Rekonstruktion (b) dargestellt. Es ist kein Unterschied zu den Bildern der Poliovirus-Infektion zu erkennen. Die PV-Vesikel sind auch hier an den ER-Membranen lokalisiert und übernehmen keine ER-Membranproteine. Maßstäbe: 2 μ m (a), 1 μ m (b), N = Nukleus.

Entstehung war dies ungünstig, da in diesen Bereichen keine einzelnen Vesikel mit der eingesetzten Methode mehr zu unterscheiden waren. Besonders in der Peripherie dieser Zellen waren jedoch vereinzelte Bereiche der 2B-Markierung in der Nähe der ER-Membranen zu erkennen. Diese Bereiche und Subregionen von Zellen, die ausschließlich vereinzelt Signal des viralen Proteins zeigten, wurden durch die 3D-Rekonstruktion genauer analysiert. Der Verlauf der Transfektion in der Zellkultur war - wie bei der Infektion mit Poliovirus - leicht asynchron, daher war es möglich, Zellen für die Untersuchung im CLSM auszusuchen, die zum Zeitpunkt der Fixierung gerade mit der Produktion der viralen Nicht-Struktur-Proteine begonnen hatten, also die viralen Proteine nicht bereits zu stark exprimierten. Abbildung 38a zeigt ein MIP eines Bildstapels einer solche Zelle nach der Dekonvolution. Die BT7-H Zellen wurden dabei 8 h nach der Transfektion von pE5 fixiert und die Proteine p63 und PV-2B mit den entsprechenden Antikörpern visualisiert. Nach der Aufnahme von Bilderstapeln durch diese Zellen wurde eine 3D-Rekonstruktion der erhaltenen Bilder durchgeführt. In Abbildung 38b ist auf einer Isosurface-Darstellung eine Anzahl mit anti 2B-Antikörper markierter Vesikel zu sehen, deren Erscheinungsbild nicht von dem der Vesikel in der Infektion abwich. Auch hier befanden sich - wie in der PV-Infektion - die meisten

Vesikel an den Membranen des ER, trugen jedoch ebenfalls keinen ER-Membranmarker p63. Die Kolokalisation beider Marker war auf die Übergangsbereiche zwischen den Membranen des ER und der Vesikel beschränkt. Weiterhin kamen - ebenfalls entsprechend der Infektion mit Poliovirus - Bereiche auf den Membranen des ER vor, die eine Kolokalisation von p63 und 2B zeigten, an denen aber noch keine Vesikel gebildet wurden.

Die Markierung dieser Zellen mit einem der zuvor verwendeten COPII-Antikörper resultierte bei diesen Experimenten trotz verschiedener Optimierungsversuche nur in einer unzureichenden Immunreaktion. Dadurch konnte die Kolokalisation der COPII-Bestandteile und des PV-2B auf den nach der Transfektion von pE5 gebildeten Vesikeln nicht untersucht werden. Der Grund hierfür könnte in der Transfektion mit Lipofectin liegen, da das aus Phospholipiden bestehende Lipofectin eventuell nach längerer Inkubation mit dem zellulären Lipidstoffwechsel interferieren könnte. Ein Hinweis für diese Vermutung ist die Tatsache, daß auch in den Zellen der gleichen transfizierten Kultur, die die viralen Proteine nicht exprimierten, nur eine unzureichende Detektion der COPII-Proteine möglich war.

Die Morphologie und die weiteren beschriebenen Charakteristika der durch die Transfektion von pE5 gebildeten Vesikel entsprachen den Vesikeln, die in der Poliovirus-Infektion gebildet wurden, weshalb aus den beschriebenen Versuchen zu vermuten war, daß die Bildung der Vesikel auch nach der Expression aller Nichtstrukturproteine ohne virale RNA-Replikation durch den zellulären COPII-Mechanismus am ER erfolgte.

3.13. Untersuchung der Poliovirus-Vesikel nach Expression des Poliovirus-Proteins 2BC in BT7-H Zellen

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, daß das Poliovirus-Protein 2BC die Bildung von Vesikeln induzieren kann, da bei alleiniger Expression dieses Proteins Vesikel im Cytoplasma der Zellen gefunden wurden, die sich in ihrer Ultrastruktur (darstellt im Elektronenmikroskop) nicht von den Vesikeln der Poliovirusinfektion unterschieden (Cho et al., 1994; Egger et al., 2000). In anderen Studien wurde jedoch zusammen mit dem Protein 2BC noch ein weiteres virales Protein (3A) beschrieben, das für die endgültige Morphologie der Poliovirus-Vesikel verantwortlich sein sollte (Suhy et al., 2000). Aufgrund dieser Ergebnisse sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob die Vesikel nach alleiniger 2BC-Expression - wie die Vesikel der Poliovirus-Infektion - durch den COPII-Mechanismus an den Membranen des ER gebildet werden. Dazu wurden BT7-H Zellen durch Lipofectin mit dem Plasmid pTM-PV2BC-AA (Teterina et al., 2001) transient transfiziert und nach der Fixierung eine Immunfluoreszenz mit den Antikörpern gegen p63 und PV-2B durchgeführt. Das Plasmid pTM-PV2BC-AA codiert unter der Kontrolle des T7-Promotors für die gesamte Sequenz des Proteins 2BC, die jedoch am 3'-Ende von Natalya Teterina durch einen Poly-A-Tail ergänzt wurde, um die Lebensdauer transkribierten RNA in den Zellen

zu erhöhen und damit die Expression des Proteins zu steigern. Nach der Aufnahme aufeinanderfolgender Z-Schnitte transfizierter Zellen im CLSM wurden die erhaltenen Bildstapel dekonvolviert, die Kolokalisation beider Marker definiert und diese zunächst als MIP abgebildet (Abb. 39a).

Die Verteilung des 2B-Markers zeigte die schon in der Expression von pE5 beobachtete

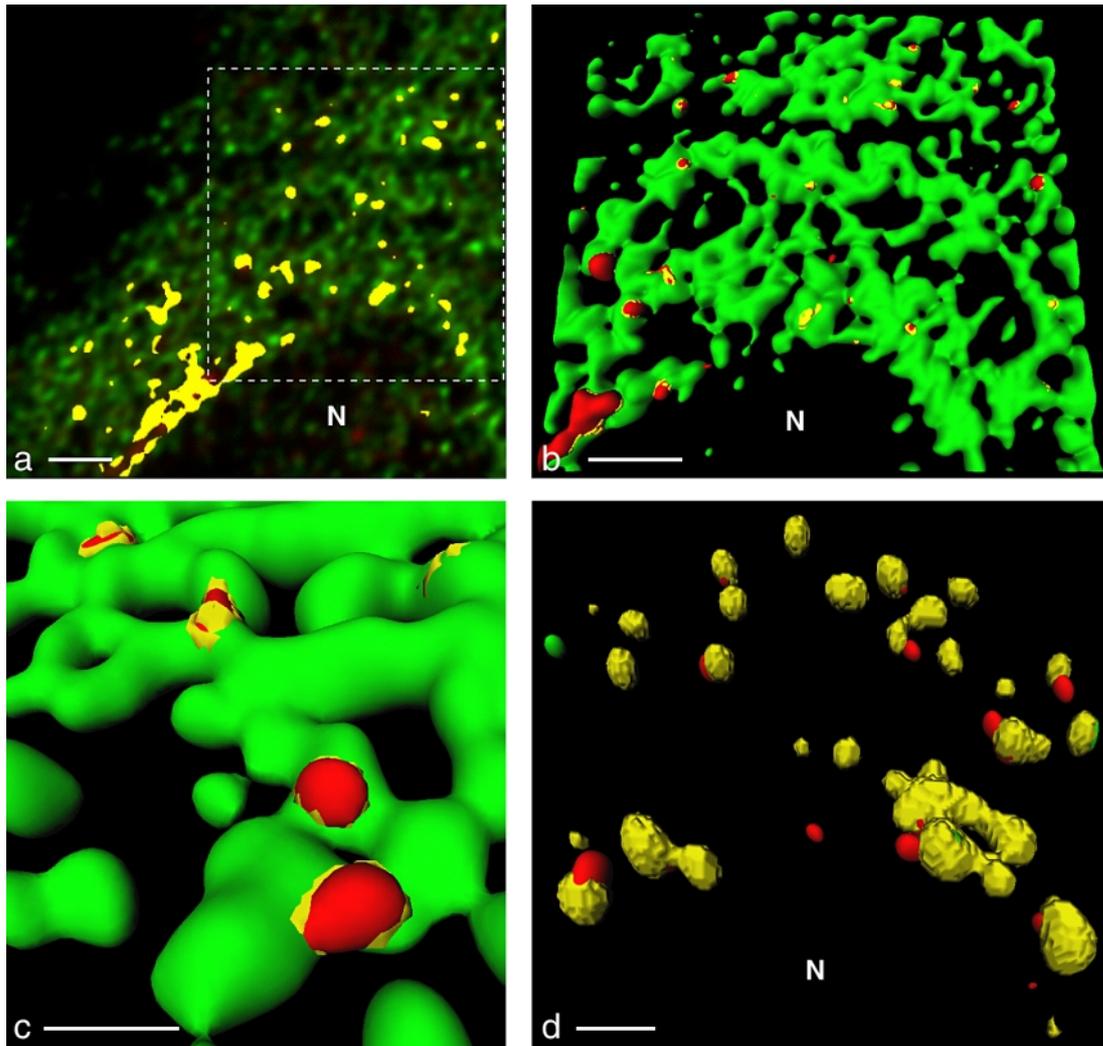


Abb. 39: Durch die Expression des PV-Proteins 2BC werden PV-Vesikel durch den zellulären COPII-Mechanismus gebildet. BT7-H Zellen wurden mit dem Plasmid pTM-2BC-AA transfiziert, 6 h nach der Transfektion fixiert und mit den Antikörpern gegen PV-2B (rot) und p63 (grün, a, b und c), sowie Sec13 (grün, d) markiert. Nach der Definition der Kolokalisation (gelb) und der Darstellung als MIP (a) und als 3D-Rekonstruktion (b und c), konnte auch bei höherer Vergrößerung (c) kein Unterschied in der Morphologie der PV-Vesikel zur Poliovirus-Infektion und zur Transfektion von pE5 detektiert werden. Die Markierung mit Sec13 und 2B zeigte eine deutliche Kolokalisation beider Marker auf vesikulären Strukturen (d). Maßstäbe: 2 μ m (a), 2 μ m (b), 0,5 μ m (c), 0,5 μ m (d).

verstärkte Lokalisation in der Nähe des Zellkerns. Jedoch wurden besonders in der Peripherie der Zellen einzelne, in punktförmigem Muster vorliegende Signale des 2B-Markers detektiert. Um diese markierten Strukturen genauer analysieren zu können wurden 3D-Rekonstruktionen der Präparate durchgeführt (Abb. 39b). Durch die 3D-Rekonstruktion konnte gezeigt werden, daß es sich bei dem detektierten 2B-Signal um einzelne Vesikel handelte, die in Kontakt mit den Membranen des ER waren. Besonders bei höherer Vergrößerung dieser Präparate wurde deutlich, daß sich die Vesikel der 2BC-Expression nicht von den Vesikeln unterschieden, die während der Infektion mit Poliovirus und bei der Expression aller Nichtstrukturproteine (Transfektion mit dem Plasmid pE5) nachgewiesen wurden. Auch die Vesikel, die durch Expression des viralen Proteins 2BC in den Zellen gebildet wurden, besaßen keine der getesteten ER-Marker auf ihrer Oberfläche und die Kolo-kalisation des Vesikel-Markers 2B mit den ER-Markern war beschränkt auf die Kontaktstellen der Vesikel mit den ER-Membranen. Die Größe der gebildeten Vesikel stimmte mit 100 nm bis 300 nm Durchmesser ebenfalls mit der Größe der Vesikel überein, die während der Poliovirus-Infektion gebildet wurden. Damit konnten die Ergebnisse der Elektronenmikroskopie der früheren Studien mit der hier angewandten Methode der Konfokalen Mikroskopie bestätigt werden.

Um zu zeigen, ob die durch die 2BC-Expression gebildeten Vesikel wie in der Infektion durch den zellulären COPII-Mechanismus gebildet wurden, wurden weitere Immunfluoreszenzanalysen mit den Antikörpern gegen die COPII-Marker Sec13 und Sec31 durchgeführt. Nach der Aufnahme von Bildstapeln, deren Dekonvolution und 3D-Rekonstruktion wurde ein hohes Maß an Kolo-kalisation von 2B sowohl mit Sec13 als auch mit Sec31 auf den Vesikeln der 2BC-Expression detektiert (in Abbildung 39d, Sec13, grün und 2B, rot; Kolo-kalisation, gelb; Kolo-kalisation von Sec31 mit 2B nicht gezeigt). Die Kolo-kalisation kam durchweg in vesikulären Strukturen vor und es gab nur kleine Populationen von reinem Signal der einzelnen Marker. Wie auch während der Infektion mit Poliovirus wurden nach der Expression von 2BC keine zellulären COPII-Vesikel ohne virales Protein mehr detektiert, wie die Histogramme dieser Bildstapel demonstrierten (nicht gezeigt).

Aufgrund der sequentiellen Bindung der COPII-Bestandteile kann auch hier von der Präsenz eines vollständigen und funktionellen COPII-Coat an den während der 2BC-Expression gebildeten Vesikel ausgegangen werden.

Die damit erzielten Ergebnisse zeigten, daß die nach 2BC-Expression gebildeten Vesikel durch den gleichen Mechanismus wie die Vesikel der PV-Infektion und Expression der PV-Nichtstrukturproteine gebildet werden. Damit wurde demonstriert, daß das virale 2BC-Protein ausreichend ist, um zur Bildung von Poliovirus-Vesikeln durch den zellulären COPII-Mechanismus zu führen, aber entgegen den früheren Hypothesen nicht die Bildung der Poliovirus-Vesikel selbst durchführt.

3.14. Weiterführende Charakterisierung der Poliovirus-Vesikel

Untersuchung der Kolokalisation eines COPI-Markers mit dem Marker für die Poliovirus-Vesikel in infizierten BT7-H Zellen

Um neben der Bestimmung der Kolokalisation der PV-Vesikel Marker mit den Bestandteilen der anterograden Transportvesikel zusätzlich einen Marker für die retrograden Transportvesikel zu untersuchen, wurde ein Antikörper gegen die Peptidsequenz EAGE (Glutaminsäure - Alanin - Glycin - Glutaminsäure) verwendet, die spezifisch für die die COPI-Untereinheit β -COP ist und daher als Marker für diese etabliert wurde (Scheel et al., 1997). Obwohl es inzwischen widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf die Bildungsorte der COPI-Vesikel gibt (siehe Einleitung), werden diese noch immer als retrograde Transportvesikel bezeichnet (Klumperman, 2000). Die Bestandteile des COPI-Coat wurden in neueren Studien neben den Membranen des cis-Golgi Apparates auch an Strukturen des ERGIC lokalisiert (Scales et al., 1997) und es wurden Hinweise darauf gefunden, daß COPI eine Rolle bei den späteren Stadien des anterograden Transports spielt (Orci et al., 1997, Scales et al., 1997). Trotzdem wurden Untersuchungen mit Immunfluoreszenzen mit Antikörpern gegen die Sequenz EAGE (β -COP) und gegen PV-2B durchgeführt, um einen Aufschluß über eine eventuelle Präsenz des COPI-Coats auf den PV-Vesikeln zu erhalten. Bei diesen Immunfluoreszenzen in Poliovirus-infizierten BT7-H Zellen mit den Antikörpern gegen EAGE und 2B im konventionellen Fluoreszenzmikroskop konnte keine Aussage über eine eventuelle Kolokalisation dieser Marker gemacht werden.

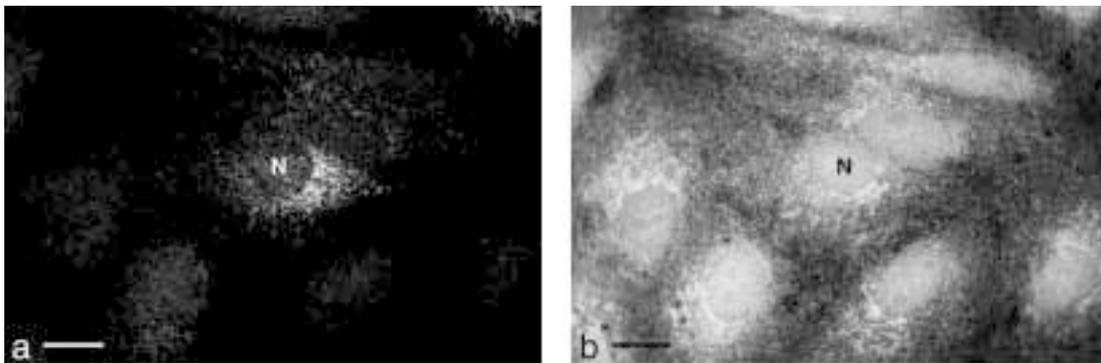


Abb. 40: Der Marker für die retrograden Transportvesikel, anti EAGE, zeigt nicht die beschriebene Markierung in BT7-H Zellen. Poliovirus-infizierte BT7-H Zellen wurden 3.30 hpi fixiert und die Marker PV-2B und EAGE (Peptidsequenz des β -COPI der retrograden Transportvesikel) markiert. Während die Markierung von 2B das typische Muster der Poliovirus-Vesikel zeigte (a), wurde durch den Antikörper gegen EAGE nur diffuses Signal im Cytoplasma und im Zellkern detektiert (b), das im perinukleären Bereich des Cytoplasmas angereichert war und dessen Lokalisierung teilweise Ähnlichkeit mit dem Golgi-Apparat hatte. Dies entsprach nicht den bisher für diesen Marker beschriebenen Lokalisierung (siehe Text). Maßstäbe: 20 μ m (a und b), N = Nukleus.

Die Markierung des anti EAGE-Antikörpers war im verwendeten experimentellen System nur diffus im Cytoplasma verteilt und konnte keinen Strukturen zugeordnet werden (Abb. 40b). Das Pattern der Fluoreszenz des anti EAGE-Antikörpers erschien wie das eines im Cytoplasma löslichen Proteins geringer Immunogenität oder wie ein starker Hintergrund der Immunreaktion, der jedoch mit den angewandten Optimierungsversuchen nicht reduziert werden konnte. Trotz der diffusen Markierung des anti EAGE-Antikörpers konnte keine ausgesprochene Übereinstimmung mit der Verteilung des Signals des 2B-Markers festgestellt werden, was gegen eine Kolokalisation von COPI und PV-2B spricht (vergleiche Abbildungen 40a und b).

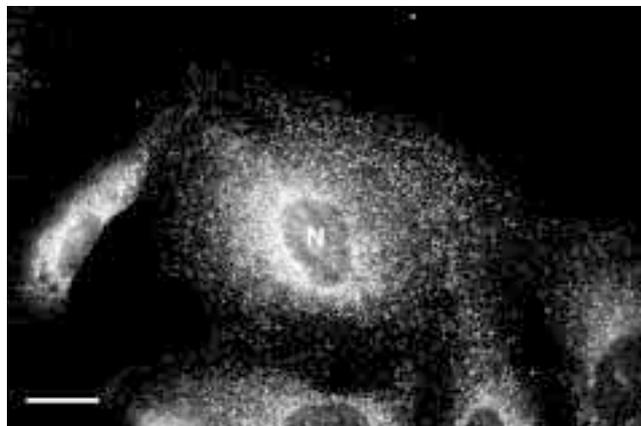
Da der COPI-Coat in Bezug auf den Ursprung der damit besetzten Transportintermediate in der Literatur nicht klar definiert war und die Ergebnisse in den beschriebenen Versuchen nicht eindeutig waren, wurde die Markierung des anti EAGE-Antikörpers nicht in Versuchen mit dem CLSM bzw. Dekonvolution und 3D-Rekonstruktion untersucht.

Untersuchung der Kolokalisation des „ER exit site“-Markers YIP1a mit dem Marker der Poliovirus-Vesikel in infizierten Zellen

Die Bildung der anterograden Transportvesikel in der uninfizierten Zelle findet - wie beschrieben - an den sogenannten „ER exit sites“ (ERES) statt, die kürzlich durch die Präsenz des Membranproteins YIP1a charakterisiert wurden (Tang et al., 2001).

Der von Tang et al. verwendete polyklonale Antikörper gegen YIP1a markiert spezifisch die Membranen der ERES und wurde daher in der vorliegenden Arbeit verwendet um zu überprüfen, ob die Bildung der Poliovirus-Vesikel, ebenfalls wie die Bildung der anterograden Transportvesikel, an den ERES stattfindet. Dazu wurden zunächst Immunfluoreszenzanalysen uninfizierter BT7-H Zellen durchgeführt, um die Funktionalität des Antikörpers in diesen Zellen zu testen. Abbildung 41 zeigt eine BT7-H Zelle im Fluoreszenzmikroskop, bei der deutlich das zuvor beschriebene vesikuläre, teils tubuläre Muster der ERES im Cytoplasma zu erkennen ist, das typisch für die Markierung mit dem anti YIP1a-Antikörper ist (Tang et al., 2001).

Abb. 41: Markierung der ER exit sites mit dem Marker YIP1a. Uninfizierte BT7-H Zellen wurden mit dem Antikörper gegen das ER exit site Protein YIP1a und dem Konjugat Cy2 markiert. Das punktförmige Muster der Markierung mit der höheren Konzentration in den perinukleären Bereichen ist charakteristisch für die Lokalisierung der ER exit sites (siehe Text). Maßstab: 20 µm, N =Nukleus.



Die starke Anreicherung des Fluoreszenzsignals im perinukleären Bereich des Cytoplasmas entsteht durch die größere Dicke der Zelle um den Nukleus herum und die Konzentration des ER in dieser Region, die entsprechend auch zu einem gehäuftem Auftreten der ERES führt. Der Antikörper gegen YIP1a war also in BT7-H Zellen funktionell und wurde weiter in der Immunfluoreszenz von Poliovirus-infizierten BT7-H Zellen zusammen mit dem Antikörper gegen PV-2B eingesetzt. Von diesen Präparaten wurden Bilderserien im konfokalen Mikroskop aufgenommen und dekonvoluiert, bzw. 3D-Rekonstruktionen von diesen erstellt.

Abbildung 42a zeigt das Histogramm einer BT7-H Zelle 3.5 hpi. markiert mit anti 2B (rot) und anti YIP1a (grün). Es ist zu erkennen, daß die Signale beider Fluorochrome überwiegend getrennt in der Zelle auftreten. Zwischen den Pixelpopulationen mit den hohen Fluoreszenzintensitäten in jeweils einem der beiden Kanäle lagen nur Pixel mit geringen Intensitäten beider Fluorochrome, es war also keine ausgeprägte Kolokalisation von 2B und YIP1a zu erkennen. Zusätzlich zum reinen Signal der beiden Fluorochrome („Finger“ der Pixelverteilung entlang der jeweiligen Achsen der Intensitäten) existierten oftmals zusätzliche Pixelpopulationen mit geringen Fluoreszenzintensitäten des jeweils zweiten Kanals. Bei der Markierung dieser Pixelpopulationen und der Darstellung der damit verbundenen Strukturen im MIP wurde jedoch deutlich, daß es sich dabei nur um einige wenige Strukturen handelte. Durch das gleichzeitige Auftreten von reinen Signalpopulationen in beiden Kanälen konnte ausgeschlossen werden, daß Durchbluten zu diesem Phänomen geführt hatte. Die geringe Anzahl und die geringe Intensität des zweiten Fluorochroms, das in diesen Pixelpopulationen vorkam, ließ auf einen kleinen, nicht repräsentativen Anteil der Vermischung beider Proteine in einigen wenigen Strukturen schließen.

Bei der Untersuchung der einzelnen Signale der Fluorochrome in den MIPs dieses Bildstapels konnten die für die YIP1a typischen vesikulären und tubulären Signale detektiert werden (Abb. 42b). Das Signal des PV-2B war hauptsächlich in einzelnen Vesikeln, teils jedoch auch in Strukturen mit eher tubulärer Morphologie zu finden, die wahrscheinlich Ansammlungen von Vesikeln darstellten (Abb. 42a). Die Kolokalisation von 2B mit YIP1a kam jedoch, wie bereits aus dem korrespondierenden Histogramm vermutet wurde, nur in wenigen Bereichen der Zellen vor. Die erwartete deutliche Kolokalisation beider Marker war nicht zu erkennen, diese war lediglich auf Bereiche beschränkt, die zwischen Strukturen lagen, in denen jeweils reine Signale beider Fluorochrome vorkamen. Die Strukturen, die Kolokalisation zwischen YIP1a und 2B zeigen, sind kleiner als die vesikulären Strukturen mit reinem Signal der beiden Fluorochrome und verbinden diese in den meisten Fällen. Die Verteilung der Fluorochrome im Histogramm und die Analyse der damit korrespondierenden Strukturen, deuten darauf hin, daß auf den 2B-markierten Poliovirus-Vesikeln nur selten das Protein YIP1a vorkommt.

In uninfizierten BT7-H Zellen wurde weiterhin - analog zur Studie von Tang et al. (2001) - eine Untersuchung der Kolokalisation von YIP1a mit Sec31 durchgeführt. Wie im Histogramm der

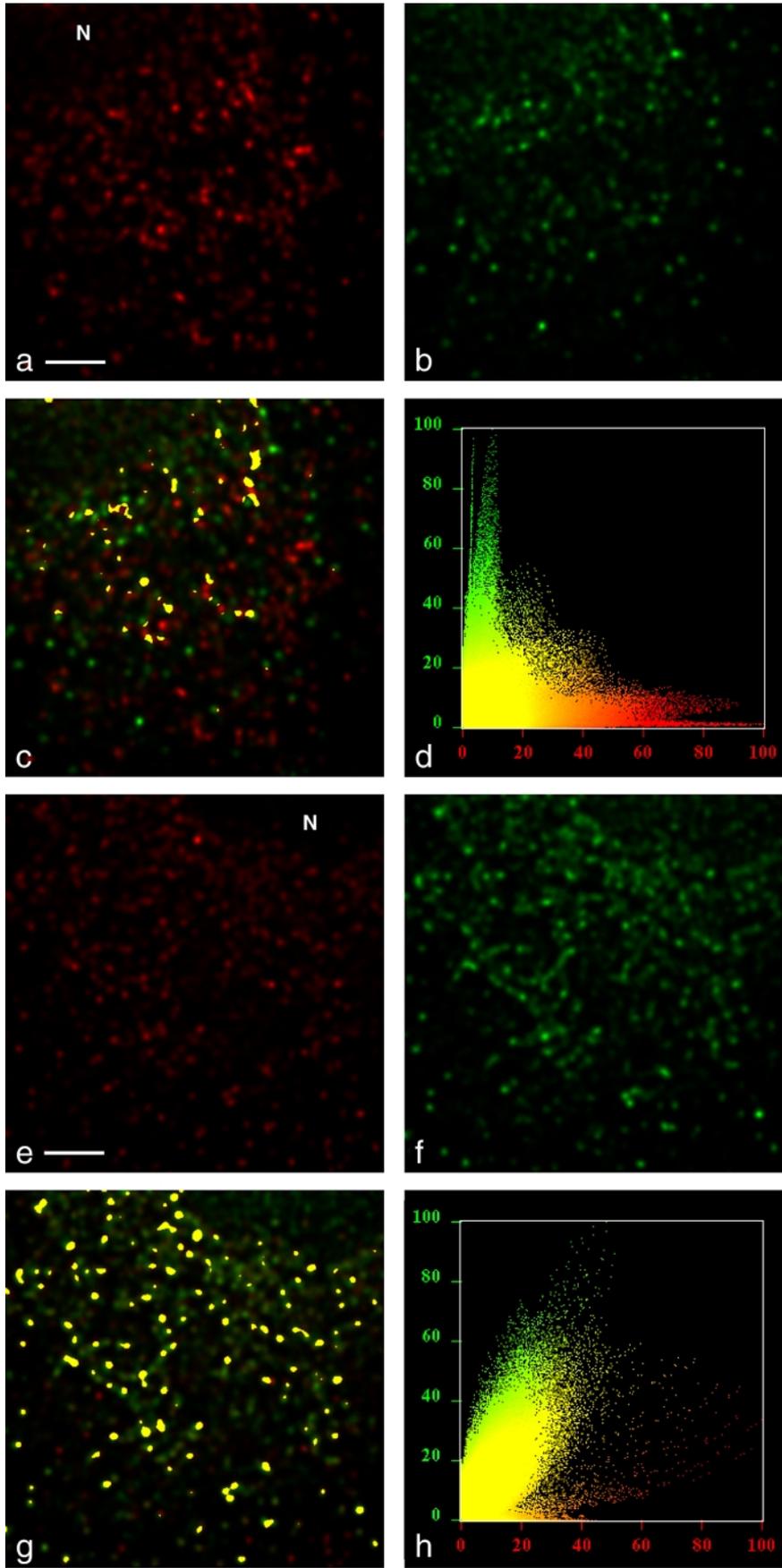


Abb. 42

Abbildung 42h zu sehen ist, zeigten diese beiden Marker eine ausgeprägte Kolokalisation, was die Pixelwolke entlang der 45 Grad Achse des Histogramms demonstriert. Dies wurde bestätigt durch die deutliche Kolokalisation der Marker im korrespondierenden MIP (Abb. 42g), die ausschließlich in vesikulären Strukturen vorkam. Nur ein geringer Teil des Signals des Sec31-Markers kommt zusätzlich zur Kolokalisation isoliert in vesikulären Strukturen vor, was darauf hindeutet, daß nur wenige anterograde Transportvesikel für die COPII-Proteine positiv sind, aber nicht mit dem ERES-Marker YIP1a besetzt sind. Diese Ergebnisse stimmen mit den publizierten Beobachtungen überein, die besagen, daß die anterograden Transportvesikel an den Membranen der ERES gebildet werden (deutliche Kolokalisation zwischen YIP1a und Sec31) und das YIP1a-Protein dabei entweder in den Membranen der ERES zurückgehalten wurde, oder nur für eine kurze Zeit in die COPII-Vesikel übernommen wird und anschließend das YIP1a wieder zurück zu den Membranen der ERES transportiert wird (Tang et al., 2001). Die Form der mit dem YIP1a-Antikörper markierten Strukturen stimmte ebenfalls mit den publizierten Ergebnissen überein, denn es handelte sich dabei häufig um tubuläre Strukturen, die teils verzweigt waren, was auf die Morphologie des ER hindeutete (siehe Abbildung 42f). Da auch der COPII-Coat schnell nach der Bildung der anterograden Transportvesikel von diesen dissoziiert und dies offenbar nicht viel später als die Dissoziation oder der Ausschluß des YIP1a von den Membranen der Vesikel geschieht, zeigen fast alle COPII-positiven Vesikel Kolokalisation mit dem ERES-Marker YIP1a.

Die Verteilung der Signale von PV-2B und YIP1a läßt darauf schließen, daß auf den Poliovirus-Vesikeln (für die in früheren Versuchen gezeigt werden konnte, daß diese fast immer COPII-Proteine enthalten) der ERES-Marker YIP1a nur selten vorkommt. Daher läßt sich vermuten, daß YIP1a bei der Bildung der Poliovirus-Vesikel - wie für die anterograden Transportvesikel von Tang et al. (2001) beschrieben - von den Membranen der Poliovirus-Vesikel ausgeschlossen wird. Jedoch wird im Gegensatz zu den anterograden Transportvesikeln der COPII-Coat auf den Poliovirus-Vesikeln wahrscheinlich stabilisiert (siehe Diskussion dieser Arbeit), daher sind Poliovirus-Vesikel auch längere Zeit nach ihrer Bildung in der Immunfluoreszenz positiv für die COPII-Proteine. Die anterograden Transportvesikel verlieren ihren COPII-Coat jedoch frühzeitig nach ihrer Bildung

Abb. 42: Poliovirus-Vesikel zeigen weniger Kolokalisation mit dem ER exit site-Marker YIP1a, als die Vesikel des anterograden Transports. In PV-infizierten Zellen (3.30 hpi) kommen die Marker der Poliovirus-Vesikel und der ERES hauptsächlich getrennt vor und ihre Kolokalisation ist auf Bereiche beschränkt, in denen beide Signale nebeneinander liegen (c). Im korrespondierenden Histogramm werden entsprechend beide Signale weitgehend getrennt dargestellt (d). Dagegen zeigen in uninfizierten Zellen alle vesikulären Strukturen, die durch den COPII-Marker Sec13 (e, rot) markiert wurden, eine deutliche Kolokalisation (g, gelb) mit dem ERES-Marker YIP1a (f, grün). Dies wird durch die Verteilung der Fluoreszenzintensitäten im korrespondierenden Histogramm (h) bestätigt. Maßstäbe: 3 µm (a und e), N = Nukleus.

und können daher in der Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen die COPII-Marker nicht mehr dargestellt werden. Aus diesem Grund kommt es wahrscheinlich zu keiner Detektion von COPII-Vesikeln ohne YIP1a-Signal in den uninfizierten Zellen.

Eine zweite mögliche Vermutung aus diesen Ergebnissen ist, daß die Poliovirus-Vesikel an anderen Stellen der ER-Membranen als den ERES gebildet werden, daher also nur wenig Kolokalisation mit YIP1a zeigen. Diese Vermutung kann jedoch mit den vorliegenden Ergebnissen nicht bestätigt werden, da nicht zwischen Poliovirus-Vesikeln unterschieden werden kann, die an den ERES gebildet wurden und danach das YIP1a verloren haben oder die nicht an den ERES gebildet wurden und daher zu keiner Zeit eine Kolokalisation von YIP1a mit PV-2B aufweisen.

Veränderungen des Cytoskeletts in Poliovirus-infizierten Zellen

Anterograde Transportvesikel werden nach ihrer Bildung an ihren Bestimmungsort in der Zelle transportiert, Poliovirus-Vesikel hingegen verbleiben in infizierten Zellen wahrscheinlich an ihrem Bildungsort und akkumulieren im Cytoplasma. Daher stellte sich die Frage, ob die Akkumulation der PV-Vesikel durch eine Veränderung oder die Zerstörung des Cytoskeletts zustande kommen könnte, da die Strukturen des Cytoskeletts für den intrazellulären Transport eine essentielle Rolle spielen (Moreau und Way, 1999) und diese ebenfalls von verschiedenen Viren für den intrazellulären Transport verwendet werden (Ploubidou und Way, 2001). Um zu untersuchen, ob sich das Cytoskelett in seiner Verteilung, Anordnung oder Integrität während der Infektion mit Poliovirus verändert wurde, wurden Immunfluoreszenzmarkierungen infizierter BT7-H Zellen mit Markern für die beiden Hauptbestandteile des Cytoskeletts, die Aktinfilamente und die Mikrotubuli durchgeführt. Aktinfilamente wurden detektiert mit einem Antikörper gegen F-Aktin und mit dem Toxin des Pilzes *Amanita phalloides*, dem Phalloidin, das spezifisch an polymerisierte Aktinmoleküle - also an F-Aktin - bindet und das direkt mit dem Fluorochrom TRITC gekoppelt war. In Abbildung 43a ist der Ausschnitt einer Zellkultur 5 h nach der Infektion mit PV Sabin1 dargestellt, die einige stark 2B-positive, also Poliovirus-infizierte Zellen (N1-N4, N6), eine Zelle mit weniger 2B-Signal (N5) und eine Anzahl uninfizierter Zellen zeigt. Im zweiten Kanal dieses Präparates (Abb. 43b) ist die Markierung des Phalloidin-TexasRed Markers gezeigt. Die uninfizierten Zellen wiesen die typische fibrilläre Markierung der Aktinfilamente durch Phalloidin aus, während die infizierten Zellen während der späten Phase der Infektion keine Markierung mit Phalloidin mehr zeigten. Alle Zellen in diesen Versuchen, die stark positiv für das 2B-Protein von Poliovirus waren, wurden nicht mehr durch Phalloidin markiert. Die Zellen, die weniger 2B-Markierung zeigten, also noch in früheren Stadien der Infektion waren, zeigten keine Veränderung in der Textur und der Anordnung der durch Phalloidin detektierten Aktinfilamente. Daraus läßt sich schließen, daß in einer späteren Phase der Poliovirus-Infektion die Aktinfilamente der infizierten Zelle depolymerisiert, also abgebaut werden. Zur Kontrolle

Allerdings kam es in den späten Phasen der Infektion zusammen mit dem Abrunden der Zellen durch den cytopathischen Effekt zu einer Kondensierung des Cytoplasma um den Zellkern herum, was ebenfalls mit einer Kondensierung der Mikrotubuli in den perinukleären Bereichen des Cytoplasmas einherging.

Diese Experimente zeigen also, daß nur in den späten Phasen der Infektion mit Poliovirus die Aktinfilamente der Wirtszelle depolymerisiert werden, während die Verteilung und Integrität der Mikrotubuli nicht wesentlich verändert wird. Das deutet darauf hin, daß es sich bei der Depolymerisierung der Aktinfilamente eventuell um einen sekundären Prozeß der Poliovirus-Infektion in der Zelle handeln könnte. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse von Doedens et al. (1994) bestätigt, die zeigen konnten, daß die Integrität des Cytoskeletts der Wirtszellen keine Voraussetzung für die Replikation des Poliovirus ist.

Untersuchung der Wirkung von H89 auf die Bildung der Poliovirus-Vesikel

Mit den vorherigen Versuchen wurde demonstriert, daß die Expression des viralen Proteins 2BC für die Rekrutierung des COPII-Coat zur Bildung von Poliovirus-Vesikeln an den Membranen des ER ausreicht. Im Verlauf dieser Arbeit wurden weitere Versuche durchgeführt, um mögliche Interaktionen des Poliovirus-Proteins 2BC mit den Proteinen des COPII-Coat in der Infektion genauer zu untersuchen. Dabei war von besonderem Interesse, ob die GTPase Sar1, der erste an die Membranen des ER bindende Bestandteil des COPII-Coat, auf den Poliovirus-Vesikeln vorhanden ist. Das Poliovirus-Protein 2BC kann GTP binden, spaltet dies aber im Gegensatz zu Sar1 nur mit sehr geringer Effizienz (Pfister und Wimmer, 1999). Die Spaltung des GTP durch Sar1 ist die Voraussetzung für die Dissoziation des COPII-Coat nach der Bildung der anterograden Transportvesikel, denn nur wenn der COPII-Coat nicht mehr auf den Vesikeln vorhanden ist, können die Faktoren, die für die Fusion mit den richtigen Zielorganellen verantwortlich sind (vSNARES), ihre Funktion ausüben (Hong, 1998; Klumperman, 2000; Antony et al., 2001). Die Substitution des Sar1 durch 2BC würde dazu führen, daß das GTP nicht gespalten werden kann und daher die Poliovirus-Vesikel nicht mit den Zielorganellen fusionieren können. Dies wäre eine elegante Erklärung für die beschriebene Akkumulation der Poliovirus-Vesikel im Cytoplasma der infizierten Zellen, auf die weitere Daten ebenfalls hinweisen, die in der Diskussion näher erläutert werden.

Da keine Antikörper gegen Sar1 für Untersuchungen in der Immunfluoreszenz erhältlich waren, wurde die Funktion von Sar1 während der Bildung der Poliovirus-Vesikel durch die Anwendung eines Inhibitors untersucht. Die Substanz H89 ist ein zellpermeabler, spezifischer Inhibitor der Bildung der anterograden Transportvesikel durch den COPII-Coat (Aridor und Balch, 2000; Lee und Linstedt, 2000), da durch ihn die Rekrutierung des Sar1 an die Membranen der ERES unterbunden wird (Lee und Linstedt, 2000). H89, ein Isochinolinsulfonamid, inhibiert

in Konzentrationen von 25 bis 100 μM , eine bisher unbekannte Proteinkinase, die den ATP-abhängigen Schritt des Austauschs von GDP mit GTP an Sar1, katalysiert (Aridor und Balch, 2000). Dadurch kann Sar1 nicht mehr an die Membranen der ERES binden und folglich der COPII-Coat nicht mehr zur Bildung der Vesikel an den ERES zusammengesetzt werden. Es konnte in Immunfluoreszenzanalysen H89-behandelter Zellen keine Markierung der anterograden Transportvesikel mit einem anti Sec13-Antikörper mehr nachgewiesen werden (Lee und Linstedt, 2000) und der anterograde Transport von VSV-G war in H89-behandelten Zellen unterbunden (Aridor und Balch, 2000). Weiterhin konnte in Rekonstitutionsexperimenten gezeigt werden, daß Sar1 nach der H89-Behandlung nicht mehr an Membranen von Mikrosomen rekrutiert wurde und daher auch keine Bindung des COPII-Coat an diese mehr stattfinden konnte (Aridor und Balch, 2000). Aufgrund dieser Ergebnisse erschien die Untersuchung der Wirkung von H89 auf die Bildung der Poliovirus-Vesikel als geeigneter Ansatz um die Anwesenheit und Funktion von Sar1 bei diesem Prozeß zu untersuchen.

Untersuchung der Wirkung von H89 in uninfizierten Zellen

Zur Untersuchung der Inhibition von H89 wurden zunächst BT7-H Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors behandelt, diese in der Immunfluoreszenz mit dem Antikörper gegen Sec13 markiert und im konventionellen Fluoreszenzmikroskop untersucht. Bei einer Konzentration von 100 μM H89 im Medium und der Inkubation von 15 min konnte nach Fixierung der Zellen in der IF das typische Muster der Sec13-Markierung, das punktförmig im Cytoplasma verteilte Signal (Abb. 44a und c), nicht mehr beobachtet werden (Abb. 44b und d). Stattdessen war das Signal der Sec13-Markierung fein granulär und diffus über das gesamte Cytoplasma der Zellen verteilt, wobei auch eine Markierung des Zellkerns auftrat (Abb. 44d). Dies bestätigte, daß bei dieser Konzentration H89 - wie zuvor beschrieben (Lee und Linstedt, 2000) - die Rekrutierung des COPII-Coat zur Vesikel-Bildung inhibierte. Allerdings wirkte das H89 stark toxisch auf die behandelten Zellen, wie an der beginnenden Ablösung der Zellen vom Untergrund in Abbildung 44b zu sehen ist. Bei geringfügig längerer Inkubation oder höher Konzentration des H89 starben die behandelten Zellen innerhalb kurzer Zeit und lösten sich von der Zellkulturschale ab, weshalb sie nicht mehr in der Immunfluoreszenz untersucht werden konnten.

Untersuchung der Wirkung von H89 in Poliovirus-infizierten Zellen im konfokalen Mikroskop

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurden Untersuchungen zur möglichen Inhibition der Bildung der Poliovirus-Vesikel durch H89 durchgeführt. Dabei stellte sich die Frage nach dem günstigsten Zeitpunkt für die Zugabe des H89, da es nur maximal 15 min auf den Zellen belassen werden konnte, ohne das diese starben. Gleichzeitig musste verhindert werden, daß bis zur Zugabe des H89 schon PV-Vesikel im Cytoplasma akkumuliert waren, die auch nach der Behandlung mit H89

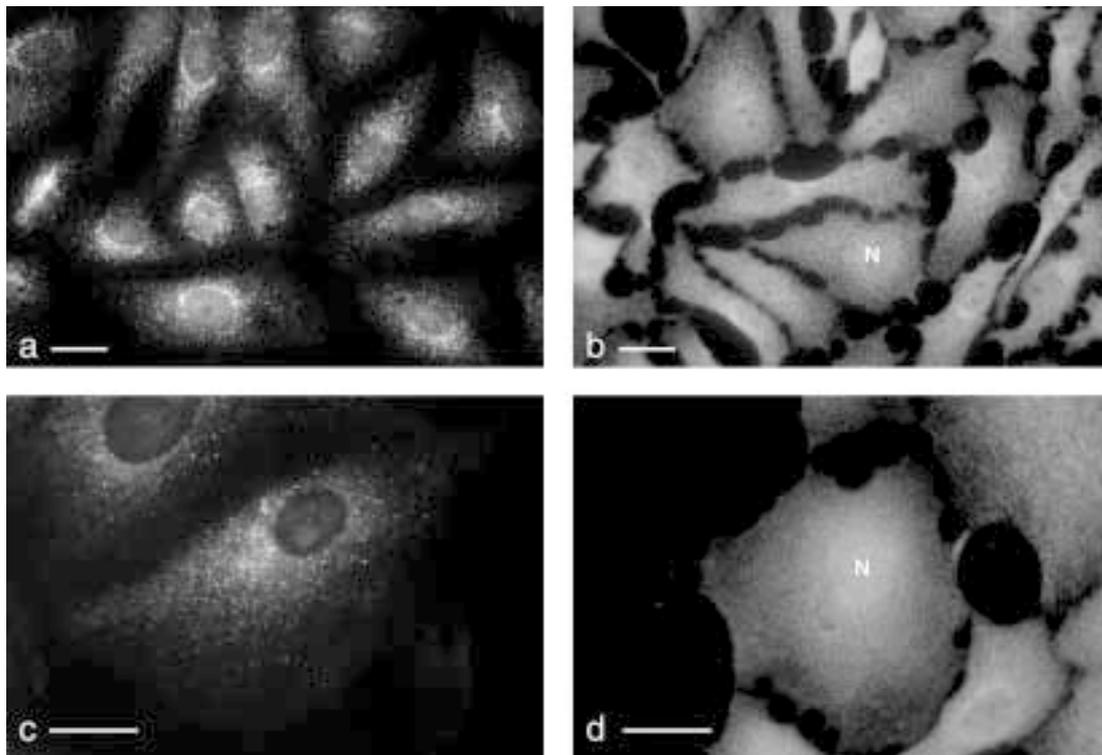


Abb. 44: Inhibierung der Bildung von COPII-Vesikeln durch H89. BT7-H Zellen wurden unbehandelt (a und c) oder nach 15 min Behandlung mit 100 μ M H89 (b und d) mit dem Antikörper gegen Sec13 markiert. In den Übersichten (a und b) ist zu sehen, daß die Markierung der COPII-Vesikel (a und c) nach H89-Behandlung in der ganzen Zellkultur nicht mehr zu detektieren ist (b). Das diffuse Sec13-Signal läßt sich keinen Strukturen zuordnen, ist jedoch auch im Nukleus vorhanden und im perinukleären Cytoplasma stärker angereichert als in der Peripherie der Zellen (d). Maßstäbe: 20 μ m (a bis d), N = Nukleus.

noch detektiert wurden und so zu falschen Aussagen über die Vesikel-Produktion während der H89-Inkubation geführt hätten. Dazu wurde in einem lichtstarken Fluoreszenzmikroskop eine Untersuchung der Zellen in der Immunfluoreszenz 2.30 h nach der Infektion mit PV Sabin1 durchgeführt, also zu dem Zeitpunkt, der in den früheren Versuchen die Detektion des viralen 2B-Markers gerade eben nicht mehr zugelassen hatte. In diesem lichtstärkeren konventionellen Fluoreszenzmikroskop und im konfokalen Mikroskop konnten zu diesem frühen Zeitpunkt die ersten Signale des 2B-Markers, und damit die Entstehung der ersten Poliovirus-Vesikel, detektiert und so die Wirkung von H89 auf diesen Prozeß dargestellt werden. In diesen Experimenten wurde 2.15 h nach der Infektion 100 μ M H89 zum Medium der BT7-H Zellen gegeben und diese 2.30 h nach der Infektion für die Immunfluoreszenz fixiert. Nach der Aufnahme von Bildserien im CLSM wurden diese dekonvolviert und die Verteilung des Sec13 und des 2B in MIPs und den korrespondierenden Histogrammen beurteilt. Abbildung 45a zeigt das MIP der 2B-Markierung einer solchen Zelle (roter Kanal, Cy3), in

dem bereits die ersten schwachen Signale des 2B-Markers, also wahrscheinlich die ersten Poliovirus-Vesikel, zu erkennen sind. Allerdings wirkt die Form des 2B-Signals zu diesen frühen Zeiten der Infektion unter H89 eher tubulär als bei Versuchen zum Zeitpunkt 2.30 hpi ohne H89-Behandlung. Das Signal des anti Sec13-Antikörpers trat in bedeutend kleineren runden Strukturen homogener verteilt im Cytoplasma auf (Abb. 45b), als in den nicht mit H89 behandelten Zellen (nicht gezeigt), dies bestätigte die Ergebnisse der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie. Allerdings hatten die Sec13-Signale eine andere Textur als in der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie, die mit den hier angewandten Methoden nicht erklärt werden konnte. Nach der Definition der Kollokalisierung wurden nur wenige Bereiche gefunden, in denen beide Marker vorkamen (Abb. 45c). Diese Strukturen hatten einen geringeren Durchmesser als die in den nicht mit H89 behandelten Zellen des selben Versuchs, die - wie in den vorherigen Experimenten gezeigt (Abb. 36) - eine deutliche Kollokalisierung der Marker Sec13 und PV-2B aufwiesen (nicht gezeigt). Im Histogramm der H89-behandelten Zelle in Abbildung 45d ist deutlich zu erkennen, daß die Signale beider Marker weitgehend getrennt im Cytoplasma vorkamen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß entweder die Poliovirus-Vesikel nach der Behandlung mit H89 keinen COPII-Coat mehr tragen, oder daß die nach H89-Behandlung detektierten 2B-positiven Strukturen ER-Membranen darstellten, an denen das 2B konzentriert wurde, aber keine Vesikel gebildet wurden, die das 2B-Protein aufnehmen konnten. Um diese Vermutungen zu überprüfen, wurden mit Poliovirus Sabin1-infizierte BT7-H Zellen 3.15 h nach der Infektion für 15 min mit H89 behandelt und 3.30 h nach der Infektion fixiert. Da die virale Proteinsyntheserate zu diesem Zeitpunkt bedeutend über den Werten 2.30 h nach der Infektion lag, war zu erwarten, daß sich die Proteine, falls sie unter H89 nicht in die Vesikel übernommen wurden, stärker in den Membranen des ER anreichern würden. Dies sollte zu einer stärkeren Kollokalisierung von p63 mit 2B als in den unbehandelten, Poliovirus-infizierten Zellen führen.

In Abbildung 45e und f sind die MIPs der Signale des 2B-Markers (Abb. 45e, rot) und p63 (45f, grün) einer solchen Zelle abgebildet. Die Textur des ER erscheint gegenüber den infizierten, aber nicht mit H89 behandelten Zellen unverändert. Dagegen erscheint das Signal des 2B-Markers nach der Behandlung mit H89 (Abb. 45e) bedeutend stärker tubulär, als das 2B-Signal der Kontrollen in denen Poliovirus-infizierte Zellen ohne H89-Behandlung für diese Proteine markiert worden waren (nicht gezeigt) und das dem der vorherigen Versuche entsprach (siehe Abbildung 27). Nach der Definition der Kollokalisierung zeigt sich im MIP, daß ein großer Teil des 2B-Signals mit dem p63-Marker auf den netzartigen Strukturen des ER kollokalisiert (Abb. 45g), was durch die statistische Darstellung der Fluoreszenzintensitäten im korrespondierenden Histogramm bestätigt werden konnte (Abb. 45h). Die Ablenkung des grünen Signals in dieser Abbildung entstand nicht durch das Durchbluten dieses Fluorochroms in den zweiten Kanal, wie durch die entsprechenden Kontrollen demonstriert werden konnte (nicht gezeigt). Im MIP waren zusätzlich zu den kollokalisierenden Bereichen vesikuläre Strukturen zu erkennen, die keine Kollokalisierung mit dem

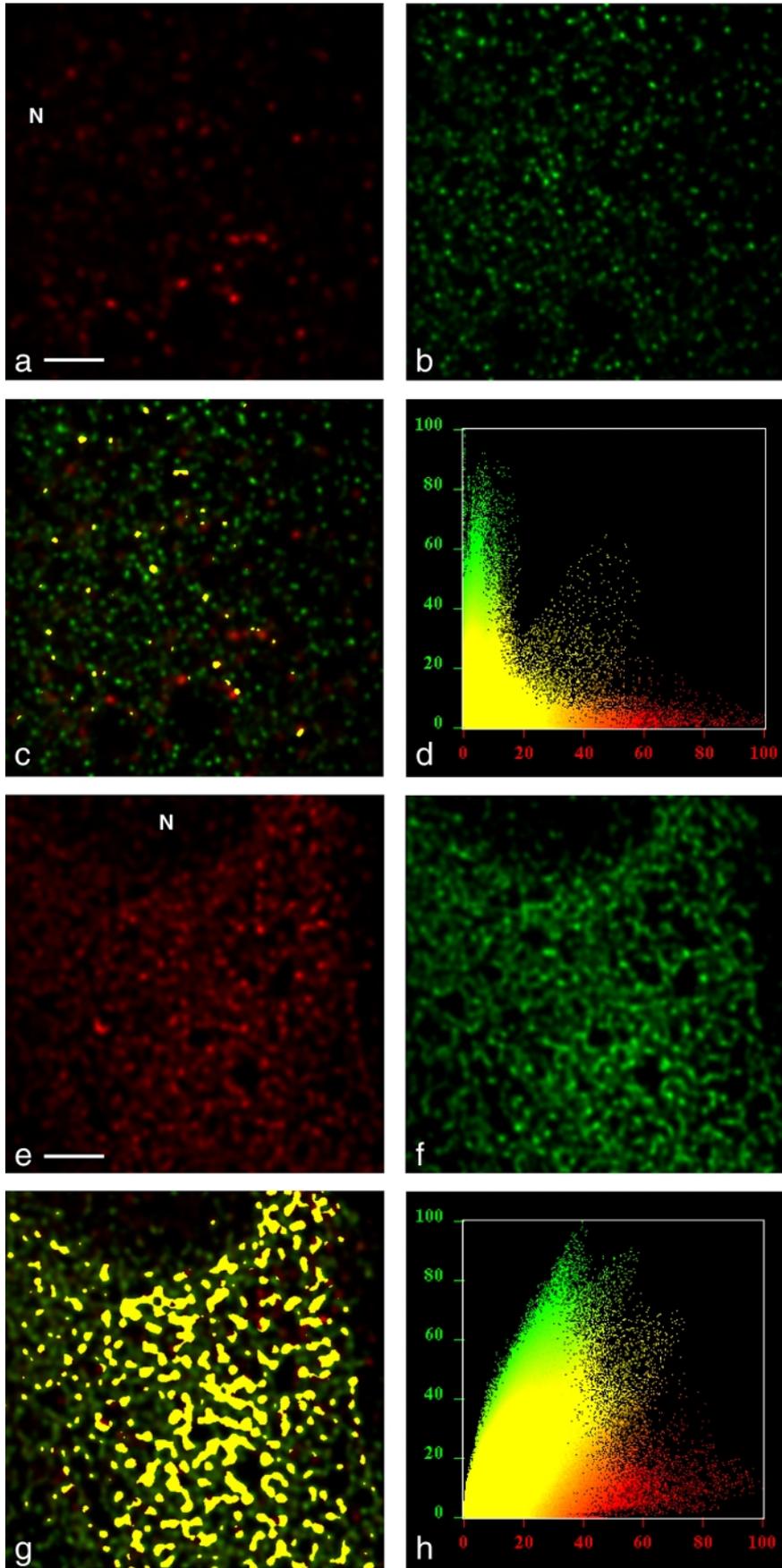


Abb. 45

ER-Marker zeigten und die wahrscheinlich vor der Behandlung mit H89 entstandene Poliovirus-Vesikel darstellten. Die Strukturen, die nach der H89-Behandlung Kolokalisation des Marker 2B und p63 aufwiesen, bestanden aus teils verzweigten, tubulären Bereichen auf dem ER-Netzwerk und ließen daher auf eine Lokalisierung des 2B-Proteins am ER schließen. Dagegen war in den nicht mit H89-behandelten Zellen, ebenfalls 3.30 h nach der Infektion mit Poliovirus, die Kolokalisation der Signale von p63 mit 2B auf Ringe und kleine Flecken beschränkt (nicht gezeigt), die Ergebnisse dieser Kontrollen entsprachen daher den zuvor gezeigten Ergebnissen mit den Markern 2B und p63 in der Poliovirus-Infektion (siehe Abbildung 27). Durch die H89-Behandlung der infizierten Zellen wurde also der Anteil der Kolokalisation des 2B-Markers mit dem ER-Marker p63 deutlich erhöht und das Signal des 2B kam verstärkt in den tubulären Strukturen des ER und weniger in Form von Vesikeln vor.

Dieser Ergebnisse deuten darauf hin, daß durch die Behandlung der Poliovirus-infizierten Zellen mit H89 auch die Bildung der Poliovirus-Vesikel inhibiert wurde und die viralen Proteine daher an den Membranen des ER angereichert wurden, da sie nicht in Vesikel übernommen werden konnten. Das spricht dafür, daß Sar1 auf den Poliovirus-Vesikeln vorhanden ist, also Sar1 bei der Bildung der Poliovirus-Vesikel nicht durch 2BC an den Membranen des ER ersetzt wird. Die zweite Möglichkeit, diese Ergebnisse zu interpretieren ist, daß Sar1 durch 2BC ersetzt werden könnte, aber auch durch H89 inhibiert wird. Diese Möglichkeiten werden in der Diskussion dargestellt. Allerdings konnte diese Hypothese mit den in der vorliegenden Arbeit angewandten Methoden nicht überprüft werden.

Untersuchung der Wirkung von H89 in Poliovirus-infizierten Zellen im Elektronenmikroskop

Um die Ergebnisse der H89-Wirkung auf die Bildung der PV-Vesikel aus dem konfokalen Mikroskop zu überprüfen, wurden die gleichen Versuche mit H89 in uninfizierten und PV-infizierten BT7-H Zellen wiederholt und diese zum Zeitpunkt 2.30 und 3.30 hpi unbehandelt oder inklusive 15 min H89-Behandlung für die Elektronenmikroskopie bzw. die Immunelektronenmikroskopie eingebettet. Mit diesen Versuchen sollte überprüft werden, ob sich nach der H89-Behandlung an den Membranen des ER das virale 2B-Protein nachweisen läßt. Da ohne H89 in der Poliovirus-Infektion der 2B-

Abb. 45: Inhibierung der Bildung der Poliovirus-Vesikel durch H89. BT7-H Zellen wurden 2.30 h (a bis d) oder 3.30 h (e bis h) nach der Infektion mit Poliovirus Sabin1 fixiert, nachdem die Kulturen 15 min vor der Fixierung mit 100 µM H89 behandelt worden waren. Die Zellen wurden anschließend mit den Antikörpern gegen PV-2B (a bis h, rot) und gegen Sec13 (a bis d, grün) oder p63 (e bis h, grün) markiert und die im CLSM aufgenommenen Bildserien dekonvoluiert. In den 2B- und Sec13-markierten Zellen war früh in der Infektion nur wenig Kolokalisation zwischen diesen beiden Markern zu detektieren (MIP, c und Histogramm, d). In den späteren Phasen der Infektion kam es nach der Behandlung mit H89 zu einer starken Kolokalisation von 2B mit dem ER-Marker p63 (MIP, g und Histogramm, h). Maßstäbe: 2 µm (a und e).

Marker ausschließlich auf den Poliovirus-Vesikeln detektiert werden konnte (Bienz et al., 1994; Egger et al., 1996), wäre dies ein weiterer Hinweis auf den möglichen Rückhalt der viralen Proteine im ER bei der Inhibition der Bildung des COPII-Coat durch H89 und damit auf die Präsenz von Sar1 an den Poliovirus-Vesikeln.

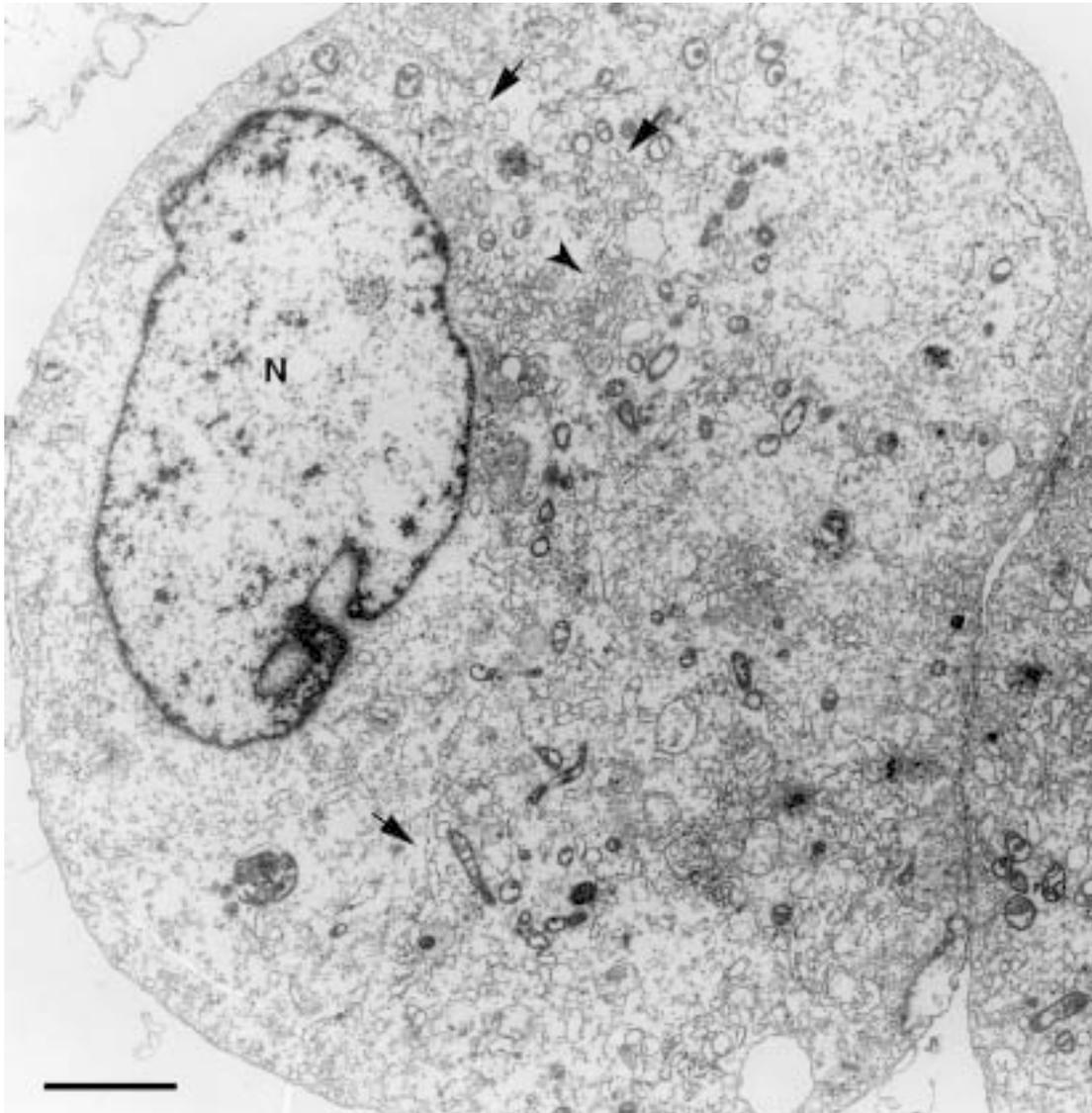


Abb. 46: Inhibierung der Bildung der Poliovirus-Vesikel durch H89 - Untersuchung in der Elektronenmikroskopie. BT7-H Zellen wurden 3.30 h nach der Infektion mit Poliovirus Sabin1 fixiert und in Epon eingebettet, nachdem die Kulturen 15 min mit 100 μ M H89 behandelt worden waren. Alle eingebetteten Zellen zeigten ein vesikuliertes ER (Pfeile), das nur schwer von den Clusters der Poliovirus-Vesikel zu unterscheiden war (Pfeilspitze). Die Struktur der Zellen ließen darauf schließen, daß diese zum Zeitpunkt der Einbettung durch die Inkubation mit H89 bereits abgestorben waren. Maßstab: 2 μ m, N = Nukleus.

In allen Zellen, die nach der Behandlung mit H89 für die Elektronenmikroskopie eingebettet wurden, wurde ausschließlich pathologisch verändertes ER gefunden. Auf der Übersicht einer in Epon eingebetteten BT7-H Zelle, die 3.30 h vor der Einbettung mit Poliovirus infiziert und 15 min. vor der Einbettung mit 100 μ M H89 behandelt worden war (Abb. 46), sind keine morphologisch unveränderten Membranen des ER mehr zu detektieren. Stattdessen kommen die Membranen des ER, die durch die Präsenz von Ribosomen identifiziert wurden, ausschließlich in Vesikeln, bzw. Vakuolen vor, die durch die Präsenz von Ribosomen als ER-Membranen identifiziert wurden und die über das ganze Cytoplasma der Zellen verteilt sind (Pfeile). Die fehlende Zellmembran und die aufgelockerte Struktur des Cytoplasma deuten darauf hin, daß die mit H89 behandelten Zellen zum Zeitpunkt der Fixierung bereits tot waren. Schon in den Immunfluoreszenzanalysen mit H89 behandelten Zellen war in der vorliegenden Arbeit festgestellt worden, daß H89 toxisch auf die Zellen wirkt und die Konzentration von 100 μ M H89 bei einer längeren Inkubation als 15 min zum Ablösen der Zellen vom Objektträger führte. Da gemäß dem Einbettungsprotokoll für die Elektronenmikroskopie und die Immunelektronenmikroskopie die Zellen zunächst für ca. 2 min trypsinisiert und für 6 min abzentrifugiert werden mußten und diese Zeiten nicht verkürzt werden konnten, verlängerte dies die Inkubationszeit mit H89. Um H89 nicht zu lang auf den Zellen zu belassen, wurde die Inkubation mit H89 vor dem Trypsinisieren auf 8 min beschränkt und dem Trypsin ebenfalls H89 zugegeben. Dies führte jedoch nicht zu besseren Ergebnissen, da in den Einbettungen dieser Versuche die Zellen ebenfalls tot waren. In Abbildung 46 sind neben dem vesikulierten ER ebenfalls Poliovirus-Vesikel zu erkennen (Pfeilspitze), die in Clusters vorkommen und durch die Fusionsmembranen vom vesikulierten ER unterschieden werden konnten. Diese waren vermutlich vor der Inkubation mit H89 gebildet worden, da im Versuch der abgebildeten Zelle erst 3.15 h nach der Infektion H89 zugegeben wurde, also zu einem Zeitpunkt, zu dem bereits die Bildung von Poliovirus-Vesikeln begonnen hatte. In den Immuneinbettungen mit LR Gold-Kunstharz ist die Strukturhaltung bedeutend schlechter, als in den Epon-Einbettungen. Daher konnte in diesen Einbettungen zwischen den Vesikeln des desintegrierten ER und den Poliovirus-Vesikeln nicht mehr unterschieden werden (nicht gezeigt). Dies machte eine eventuelle Lokalisation der 2B-Proteine an den Membranen des ER unmöglich.

Aus diesen Gründen führte die Elektronenmikroskopie nicht zu weiteren Aussagen bezüglich der Wirkung des H89 auf die Bildung der Poliovirus-Vesikel, bzw. bezüglich der Anwesenheit von Sar1 auf den Poliovirus-Vesikeln.

Markierung Poliovirus-infizierter Zellen mit anti ERGIC53- und anti rbet1-Antikörpern

Um Informationen über die Poliovirus-Vesikel nach ihrer Bildung zu erhalten und eventuelle Gründe für deren Akkumulation im Cytoplasma der infizierten Zellen zu finden, wurde nach der Präsenz weiterer zellulärer Proteine auf den PV-Vesikeln gesucht. Zunächst wurde dafür ein

Marker für das „ER Golgi Intermediate Compartment“, das sogenannte ERGIC eingesetzt. Das Protein ERGIC53 kommt ausschließlich in den Membranen dieses, auf dem Transportweg zwischen ER und Golgi-Apparat liegenden, Kompartiments vor.

Die anterograden Transportvesikel fusionieren mit dem ERGIC bevor sie weiter zum Golgi-Apparat transportiert werden und es wurde eine Kollokalisierung dieses Markers mit den Bestandteilen des COPII-Coat der anterograden Transportvesikel nachgewiesen (Scales et al., 1997; Tang et al., 1997; Lavoie et al., 1999). Dies ist ein Widerspruch zu den Ergebnissen, die besagen, daß die anterograden Transportvesikel den COPII-Coat schnell verlieren und erst mit anderen Organellen fusionieren können, wenn sie keinen COPII-Coat mehr aufweisen (Antonny et al., 2001). Dieser Widerspruch kann derzeit nicht erklärt werden, es ist jedoch möglich, daß auch an den Membranen des ERGIC COPII-positive Strukturen vorkommen, da Übergänge des ERGIC zum ER nachgewiesen werden konnten (Balch et al., 1994; Presley et al., 1997; Scales et al., 1997; Alvarez et al., 1999).

Eine Untersuchung der Kollokalisierung der Marker für die Poliovirus-Vesikel und für das ERGIC könnte trotzdem Aufschluß darüber geben, ob die Poliovirus-Vesikel im Cytoplasma der Zelle akkumulieren, da sie nicht mehr mit den Membranen der Zielorganellen fusionieren können. In einem ersten Ansatz wurden Poliovirus-infizierte Zellen 3.30 h nach der Infektion für die Immunfluoreszenz fixiert und mit Antikörpern gegen die Marker 2C und ERGIC53 behandelt. In diesen Versuchen wurde anstelle des bisher verwendeten monoklonalen anti 2B-Antikörpers, ein polyklonales Kaninchen-Antiserum gegen das Poliovirus-Protein 2C eingesetzt, da ausschließlich ein monoklonaler Antikörper gegen ERGIC53 vorlag, also eine Untersuchung durch Doppelimmunfluoreszenz nicht möglich war. Der Antikörper gegen 2C detektierte neben dem Protein 2C ebenfalls dessen Precursor 2BC, zeigte aber einen stärkeren Hintergrund und ein schwächeres Signal als der zuvor verwendete anti 2B-Antikörper. Das Protein 2C wurde ebenfalls bereits als Marker für die Poliovirus-Vesikel definiert, da es ausschließlich mit den Membranen der Vesikel assoziiert ist (Pasamontes et al., 1986; Bienz et al., 1987). Von den so markierten Präparaten wurden Bildserien aufgenommen und dekonvolviert.

In Abbildung 47 (a und b) sind die einzelnen Kanäle einer solchen Bildserie als MIP dargestellt. Der anti 2C-Antikörper zeigte ein etwas diffuseres Signal und einen stärkeren Hintergrund als die gewohnte Markierung mit dem zuvor verwendeten anti 2B-Antikörper, es wurden jedoch trotzdem vesikuläre Strukturen durch diesen Antikörper markiert (Abb. 47a, grün), die morphologisch den durch den anti 2B-Antikörper markierten Strukturen ähnlich waren. Das Signal von ERGIC53 entsprach der erwarteten Verteilung in kleinen vesikulär-tubulären Strukturen, die im ganzen Cytoplasma auftraten und das ERGIC repräsentieren (Abb. 47b, rot). Nach der Definition der Kollokalisierung war im MIP zu erkennen, daß es nicht viele Bereiche in den Zellen gab, die beide Marker trugen (gelb, Abb. 47c), was ebenfalls durch das

korrespondierende Histogramm bestätigt wurde (Abb. 47d). Die Signale beider Marker waren weitgehend getrennt und zeigten weniger Kolo­kalisierung, als entsprechend der bekannten starken Kolo­kalisierung von Markern der anterograden Transportvesikel und dem ERGIC erwartet wurde. Daraus läßt sich schließen, daß die Poliovirus-Vesikel früh in der Infektion wahrscheinlich nicht mit dem ERGIC fusionieren.

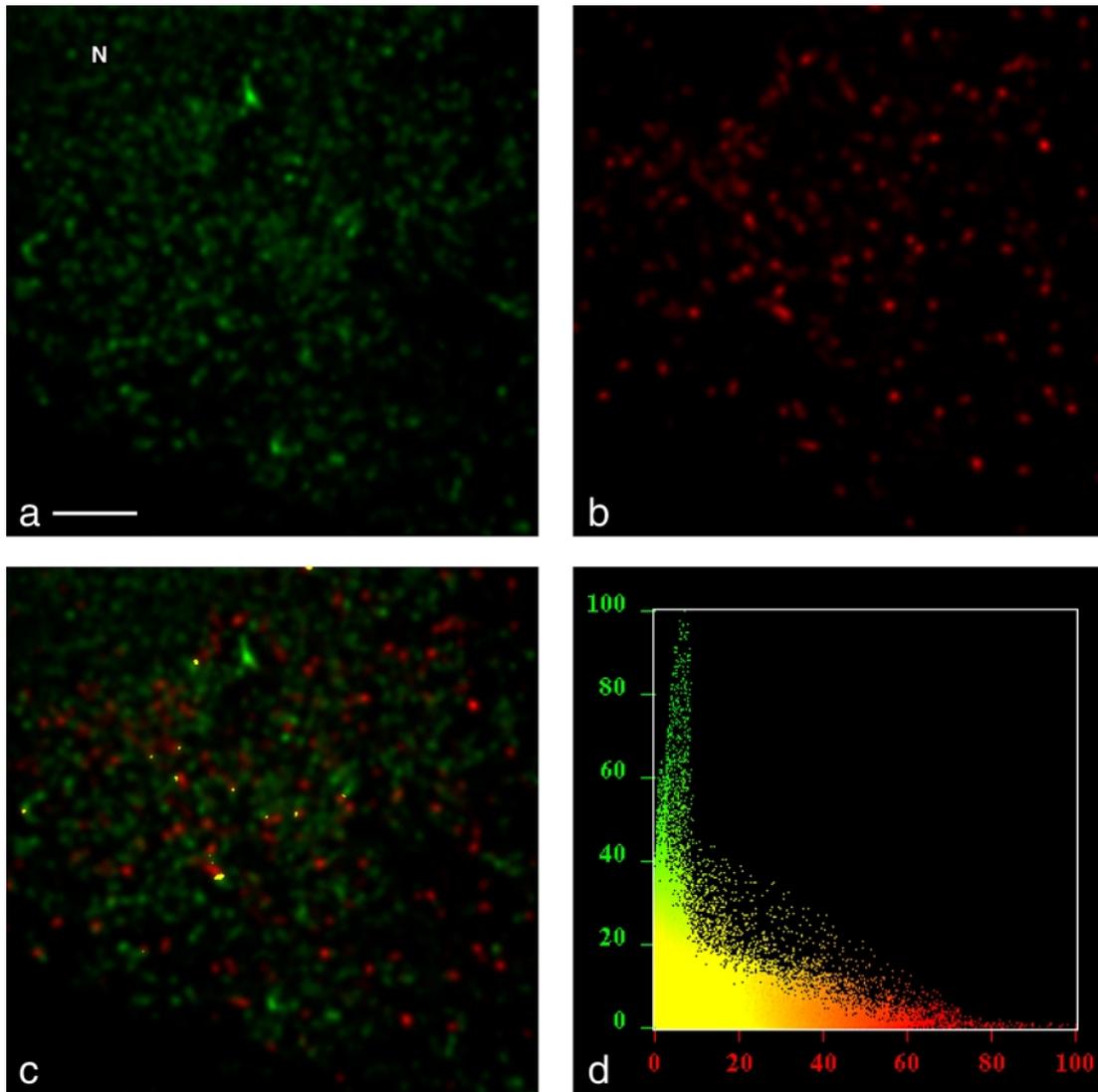


Abb. 47: Der Marker für die Poliovirus-Vesikel kolokalisiert nicht mit ERGIC53. BT7-H Zellen wurden mit Poliovirus Sabin1 infiziert und nach der Fixierung mit Antikörpern gegen PV-2C (a, grün) und ERGIC53 (b, rot) markiert. Im MIP der dekonvolvierten und übereinandergelegten Bildserien (c) und dem korrespondierenden Histogramm (d) ist nur eine geringe Kolo­kalisierung beider Marker zu erkennen. Maßstab: 3 μ m, N = Nukleus.

Eine weiterer Ansatz, eventuelle Ursachen für die Akkumulation der PV-Vesikel in der Wirtszelle zu finden, war die Untersuchung der Präsenz von sogenannten v-SNAREs auf den Membranen der PV-Vesikel. vSNAREs sind zelluläre Proteine, die für die Fusion der anterograden Transportvesikel mit den Membranen der nachgelagerten Organellen des sekretorischen Transports essentiell sind. Nach der Dissoziation des COPII-Coats im Anschluß an die Bildung der anterograden Transportvesikel werden die vSNAREs an deren Membranen präsentiert und induzieren über Interaktionen mit entsprechenden Partnerproteinen der Zielorganellen (tSNAREs) die Fusion der Vesikel der Membranen dieser Organellen. Ohne die Anwesenheit dieser vSNAREs auf den Membranen der anterograden Transportvesikel können diese nicht mit den Zielorganellen fusionieren (Hong, 1998, Klumperman, 2000). Daher wäre es möglich, daß diese Faktoren nicht auf den Membranen der Poliovirus-Vesikel vorhanden sind und die Vesikel dadurch im Cytoplasma akkumulieren.



Abb. 48: Der Antikörper gegen das vSNARE *rbet1* zeigt nicht die beschriebene Markierung in BT7-H Zellen. Uninfizierte BT7-H Zellen wurden mit dem Antikörper gegen *rbet1* und dem Konjugat Cy2 markiert. Diese Zellen zeigten - im Gegensatz zu den publizierten Daten (siehe Text) - im konventionellen Fluoreszenzmikroskop ausschließlich eine diffuse Fluoreszenz im Cytoplasma sowie eine starke Markierung des Nukleus. Maßstab: 10 µm N = Nukleus.

Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde zunächst der für diese Versuche verwendete polyklonale Kaninchen-Antikörper gegen den cytoplasmatischen Teil des Transmembranproteins *rbet1*, einem der zellulären vSNAREs, in der Immunfluoreszenz in uninfizierten BT7-H Zellen getestet (Zhang et al., 1997). *rbet1* kam in den zuvor veröffentlichten Arbeiten in einem vesikulären, teils leicht tubulären Muster im Cytoplasma der Zellen vor, dies entspricht der typischen Verteilung des Signals der Markierung der ERES und der anterograden Transportvesikel (Zhang et al., 1997; Xu et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch trotz verschiedener Versuche zur Optimierung des Signals des *rbet1*-Antiserums, diese Markierung in den verwendeten BT7-H Zellen nicht bestätigt

werden. Statt der erwarteten punktförmigen Verteilung konnte nur eine homogene, diffuse Markierung im Cytoplasma der Zellen detektiert werden (Abb. 48). Zusätzlich wurde ein starkes Signal des Markers im Innern des Zellkerns gefunden, die in den Original-Arbeiten mit diesem Antiserum nicht detektiert wurde. Diese Beobachtungen deuten daraufhin, daß der verwendete Antikörper in BT7-H Zellen das Protein rbet1 nicht spezifisch markiert. Auch mit einem zweiten Antiserum konnte keine aussagekräftige Markierung der rbet1-enthaltenden Strukturen in den Zellen erreicht werden. Aus diesem Grund konnte keine weitere Aussage über eine eventuelle Kolokalisation dieses vSNAREs mit den viralen Proteinen auf der Oberfläche der Poliovirus-Vesikel gemacht werden.

4. Diskussion

4.1. Etablierung des experimentellen Systems zur Untersuchung der Bildung der Poliovirus-Vesikel

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete experimentelle System zur Untersuchung der Bildung der Poliovirus-Vesikel, in dem die BT7-H Zellen der afrikanischen grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) mit dem Poliovirus-Stamm Sabin1 infiziert wurden, erwies sich für die Untersuchungen mit den verschiedenen in dieser Arbeit angewandten Methoden als gut geeignet. BT7-H Zellen wurden aus zwei Gründen für die Untersuchungen in dieser Arbeit verwendet. Monolayer-Kulturen der BT7-H Zellen wurden im Gegensatz zu den zuvor häufig eingesetzten Suspensionskulturen verwendet, da erstens Zellen im Monolayer eine ausgebreitete Form annehmen und zweitens diese nicht wie Suspensionskulturen vor der Fixierung auf einen Objektträger aufgebracht werden müssen, um sie für die Mikroskopie zu immobilisieren (Bienz et al., 1973; 1987; Egger et al., 1996; Bolten et al., 1998). Das Aufbringen der abgerundeten Zellen der Suspensions-Kulturen auf einen Objektträger führt durch die Flexibilität des Zellkörpers zu einer sekundären Veränderung der Anordnung der Zellorganellen. Die ausgebreitete Form der verwendeten BT7-H Zellen in Monolayer-Kulturen vereinfachte die Untersuchung der Verteilung der Poliovirus-Vesikel, besonders mit lichtmikroskopischen Techniken. Die geringe Dicke der BT7-H Zellen - besonders in deren Peripherie - führte zu einer besseren Auflösung der Aufnahmen im konventionellen Fluoreszenzmikroskop und zu einer Reduktion der benötigten optischen Schnitte bei der Aufnahme von Bildstapeln mit dem konfokalen Mikroskop. Der zweite Vorteil der Verwendung der BT7-H Zellen bestand in der Tatsache, daß diese von der Zelllinie BSC-1 abgeleiteten Zellen mit dem Plasmid pOS2 stabil transfiziert worden waren und daher die RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 exprimierten (Whetter et al., 1994). Dadurch konnten einzelne Proteine in den BT7-H Zellen exprimiert werden, deren Gene unter der Kontrolle des T7-Promotors standen und die auf einem Plasmid in die Zellen transfiziert wurden (Whetter et al., 1994). In anderen Systemen müssen die Zellen dazu z. B. mit einem rekombinanten Vaccinia-Virus (vTF7-3; Fuerst et al., 1986) infiziert werden, das das Gen für die T7-Polymerase trägt. Die Infektion mit Vaccinia-Virus führt jedoch ebenfalls zu einem cytopathischen Effekt und es wurde gezeigt, daß verschiedene Proteine des Vaccinia-Virus mit Teilen des sekretorischen Transportwegs interagieren (z.B. ER und ERGIC, Salmons et al., 1997).

Die Verwendung des Poliovirus-Stamms Sabin1, der Impfstamm für die orale Poliovirus Vakzine (OPV), ergab sich aus den Empfehlungen der WHO im Polio-Eradikationsprogramm. In diesem Programm wurde zu Beginn dieser Arbeit die Verwendung der Poliovirus Wildtypstämme, also auch des bisher für die Untersuchungen der Membranveränderungen eingesetzten Stamms Mahoney1 (Bienz et al., 1990; Egger et al., 1996; Schlegel et al., 1996; Bolten et al., 1998) eingeschränkt. Um nicht während dieser Arbeit den Virusstamm wechseln zu müssen, wurde schon kurz nach deren Beginn auf Poliovirus Sabin1 umgestellt, dessen Verwendung für eine längere

Übergangsfrist von der WHO gestattet ist. Schon in früheren Arbeiten zur Untersuchung der Replikation des Impfstamms PV Sabin1 konnte gezeigt werden, daß dieser in Primaten-Zellkulturen die gleichen cytopathischen Effekte zeigte, wie der korrespondierende Wildtypstamm Mahoney1 (K. Bienz, persönliche Mitteilung). Die Infektion mit Sabin1 führt ebenfalls nach wenigen Stunden zum Absterben der Zellkultur und auch die Bildung der intrazellulären Membranveränderungen während der Infektion unterscheidet sich nicht vom Wildtypvirus.

Poliovirus Sabin1 unterscheidet sich lediglich im Neurotropismus vom Wildtyp Mahoney1, der neuronale Zellen und besonders Motoneuronen infiziert und durch die in diesen Zellen Membranveränderungen induziert. Während die Infektion mit Mahoney1 zum Absterben von Motoneuronen führt, hat die Infektion mit Sabin1 nicht diesen Effekt. Eine Erklärung für diese Unterschiede im Neurotropismus ist bisher nicht bekannt, es wurde jedoch vermutet, daß bestimmte zelluläre Faktoren in den Neuronen fehlen, die die interne Translationsinitiation an der Sabin1-IRES ermöglichen und die von Mahoney1 nicht benötigt werden (Gromeier et al., 1999). Solche zellulären Faktoren konnten bisher noch nicht isoliert werden, es wird jedoch vermutet, daß diese mit der „stem loop“-Struktur V der Poliovirus-IRES interagieren, da in diesem Bereich der einzige Unterschied in der IRES von Poliovirus Sabin1 und Mahoney1 existiert.

In dieser Arbeit wurde zunächst gezeigt, daß BT7-H Zellen, die bisher nur für die Infektion mit Hepatitis A-Virus (Whetter et al., 1994; Schultz et al., 1996) oder die Transfektion mit Hepatitis C-Virus-Konstrukten (Reynolds et al., 1995) verwendet worden waren, ebenfalls mit Poliovirus Sabin1 infizierbar waren und das der Verlauf der Infektion mit den gleichen strukturellen Veränderung einherging, wie in den bisher beschriebenen Systemen. Dies konnte durch die Untersuchung der Bildung und Verteilung des viralen Vesikel-Markers 2B in der Immunfluoreszenz und der Kinetik der viralen Proteinsynthese, sowie durch die Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Bildung der Poliovirus-Vesikel im Elektronenmikroskop gezeigt werden. Die Infektion der BT7-H Zellkultur mit Poliovirus Sabin1 verlief jedoch asynchron, daher wurden - um eine Synchronisation der Infektion zu erreichen - die im Ergebnis-Teil beschriebenen Veränderungen des Protokolls der Infektion eingeführt, durch die die Infektionseffizienz auf über 60% bei 3.30 hpi gesteigert werden konnte. Der Verlauf der Infektion von Poliovirus in den BT7-H Zellen war auch nach den beschriebenen Optimierungen nicht vollständig synchronisiert, konnte jedoch nicht weiter optimiert werden. Ein Grund dafür könnte eine Kopplung des Verlaufs der Poliovirus-Infektion an den Zellzyklus der Wirtszelle sein, der in der Zellkultur nicht synchronisiert ist. Für diese Kopplung der Infektion an den Zellzyklus gibt es bei anderen Picornaviren bereits Hinweise (E. Lepori, persönliche Mitteilungen). Für die vorliegende Arbeit erwies sich die leichte Asynchronität der Infektion jedoch als vorteilhaft, da aufgrund der Variation des Infektionsverlaufs zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion Zellen untersucht werden konnten, in denen die Bildung der ersten Vesikel gerade begonnen

hatte, bzw. das erste Signal des 2B-Proteins detektiert wurde. Durch den asynchronen Infektionsverlauf konnte außerdem eine Unterscheidung zwischen uninfizierten Zellen und infizierten Zellen innerhalb der selben Zellkultur durchgeführt werden. Dies ermöglichte z.B. in den Immunfluoreszenzanalysen die objektive Abschätzung der Hintergrundfluoreszenz in uninfizierten Zellen oder den direkten Vergleich der Textur des ER infizierter und uninfizierter Zellen (siehe Abb. 26).

Durch die Untersuchungen der Immunfluoreszenz, der Elektronenmikroskopie und der Kinetik der Proteinsynthese infizierter BT7-H Zellen wurde der Zeitpunkt 3.30 h nach der Infektion als optimaler Zeitpunkt festgelegt, um die Entstehung der Poliovirus-Vesikel zu untersuchen. Zum nächst früheren untersuchten Zeitpunkt, bei 3 hpi, konnte nur ein sehr schwaches spezifisches Signal des 2B-Markers in der Immunfluoreszenz detektiert werden, das sich nicht deutlich über die Hintergrundfluoreszenz abhob (Abb. 18). Im Elektronenmikroskop wurden 3 hpi zwar bereits vereinzelte Vesikel entdeckt, die jedoch aufgrund der fehlenden Fusionsmembranen nicht als Poliovirus-Vesikel identifiziert werden konnten (Abb. 17). Außerdem waren diese vereinzelt Vesikel sehr selten in den Einbettungen zu finden und ermöglichten daher keine repräsentativen Aussagen über die Verteilung der Poliovirus-Vesikel in der infizierten Zelle. Im Elektronenmikroskop traten zum Zeitpunkt 3.30 h nach der Infektion mit PV Sabin1 bereits eine Anzahl Vesikel-Cluster auf, die jedoch mit einer Zahl von meist 4 bis 5 Vesikeln pro Cluster eine geringe Größe hatten. Die in den elektronenoptischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit auffällige Nähe der kleinen Vesikel-Cluster bzw. einzelner Vesikel zum ER wurde bereits in früheren Arbeiten beschrieben (Bienz et al., 1987). In dieser Publikation wurde durch die Elektronenmikroskopie gezeigt, daß Vorwölbungen des ER mit der Größe und Form der Poliovirus-Vesikel in Poliovirus-infizierten Hep-2 Zellen vorkamen (Bienz et al., 1987). Diese Vorwölbungen zeigten jeweils zu einer Seite eines ER-Tubulus und wiesen keine Ribosomen auf, während an der gegenüberliegenden Seite des ER Ribosomen an den Membranen gebunden waren. Untersuchungen mittels Immunocytochemie zeigten, daß einzelne Vesikel, die in Kontakt mit den Membranen des ER waren, durch einen Antikörper gegen das virale Protein 2B markiert wurden (Bienz et al., 1987). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vermutet, daß die Poliovirus-Vesikel an den Membranen des ER gebildet werden. Es konnte jedoch nicht gezeigt werden, ob es sich bei den beobachteten Vesikeln um einen Fusionsprozeß oder tatsächlich um die Bildung der Vesikel am ER handelte. In der gleichen Studie konnte in einem eleganten Ansatz mittels Autoradiographie auf Dünnschnitten an den Vesikeln bzw. Vesikel-Clusters, die in Kontakt mit dem ER waren, die Synthese viraler RNA nachgewiesen werden (Bienz et al., 1987). Das in der vorliegenden Arbeit detektierte Poliovirus-Protein 2B kommt ausschließlich an den Membranen der Poliovirus-Vesikel vor (Bienz et al., 1994; Egger et al., 1996), entsprechend war die Verteilung des 2B-Proteins in der Immunfluoreszenz vergleichbar mit der im Elektronenmikroskop beobachteten Verteilung der Poliovirus-Vesikel. Das erste in der

Immunfluoreszenz detektierbare Signal des Proteins 2B trat in einzelnen punktförmigen Strukturen auf, die im Cytoplasma der infizierten Zellen verteilt waren, und zeigte die Entstehung der ersten Poliovirus-Vesikel bzw. Vesikel-Cluster (Abb. 16 bis 18). In den späteren Phasen der Infektion nahm die Größe der PV-Vesikel-Cluster sukzessive zu, was ebenfalls mit der Zunahme der Größe der 2B-markierten Strukturen in der Immunfluoreszenz korrelierte. Das beobachtete stärkere Signal des 2B-Markers in den perinukleären Bereichen des Cytoplasmas (Abb. 18), konnte ebenfalls durch die Elektronenmikroskopie bestätigt werden, die eine verstärkte Akkumulation der Poliovirus-Vesikel in den zentralen Bereichen der infizierten Zellen dokumentierte (Bienz et al., 1994). Die homogene Verteilung des 2B-Signals in der Immunfluoreszenz zu späteren Zeiten der Infektion in der vorliegenden Arbeit (Abb. 18), korrelierte mit der starken Akkumulation der Poliovirus-Vesikel und der Bildung großer Vesikelfelder, die im Elektronenmikroskop in dieser Arbeit beobachtet wurden (Abb. 16 und 17) und bereits früher publiziert worden waren (Dales et al., 1965; Bienz et al., 1994). Im Gegensatz zu den untersuchten Suspensionskulturen (Bienz et al., 1994), war jedoch in den Versuchen der vorliegenden Arbeit, auch zu den späten Zeitpunkten der Infektion, die Verdrängung des Zellkerns durch die Poliovirus-Vesikel nicht zu beobachten (Abb. 16 und 17). Im Gegensatz zu den publizierten Ergebnissen zum Verlauf der Poliovirus-Infektion in Suspensionskulturen von Hep-2 Zellen (Bienz et al., 1980), war außerdem die Zunahme und das Maximum der viralen Proteinsynthese im Verlauf der Poliovirus-Infektion der BT7-H Monolayer-Zellkulturen verzögert (Abb. 20). Zur Darstellung eines Zeitverlaufs der Detektion viraler RNA durch FISH wurden in dieser Arbeit keine Versuche durchgeführt. Der Verlauf der Proteinsynthese in Poliovirus-infizierten BT7-H Kulturen wurde jedoch durch die Bestimmung der Radioaktivität markierter Aminosäuren der nach der Infektion synthetisierten Proteine untersucht. Dabei wurde das Maximum der Proteinsynthese in den Poliovirus-infizierten BT7-H Zellen 4.30 h nach der Infektion erreicht, während das Maximum der viralen Proteinsynthese in HEp-2 Suspensions-Kulturen schon bei 2.30 hpi erreicht wurde. Diese Verzögerung des Poliovirus-Infektionszyklus in den untersuchten BT7-H Zellen ist wahrscheinlich auf die Kultivierung der Zellen als Monolayer zurückzuführen. Die Kultivierung von HeLa Zellen als Monolayer resultiert ebenfalls in einer deutlichen Verzögerung der Poliovirus-Translation und Replikation gegenüber Suspensionskulturen von HeLa Zellen (D. Egger und K. Bienz, persönliche Mitteilungen). Entsprechend der Ergebnisse der Detektion der viralen P2-Proteine in Poliovirus-infizierten HEp-2 Suspensions-Kulturen, war neben dem Verlauf der viralen Proteinsynthese ebenfalls die Verteilung und Stärke des Signals des Proteins 2B in den Versuchen der vorliegenden Arbeit verzögert. Die erste Detektion des typischen punktuellen 2B-Signals im Cytoplasma der Poliovirus-infizierten BT7-H Zellen war ab 3.30 hpi möglich, während in HEp-2 Suspensionskulturen schon 2 hpi ein deutliches Signal des P2-Proteine (nachgewiesen durch einen Antikörper gegen 2C) zu detektieren war (Bolten et al., 1998). Obwohl die Auflösung der von Bolten et al. (1998) gezeigten Aufnahmen nicht so hoch war, wie die in der

vorliegenden Arbeit, konnte daraus abgeleitet werden, daß die Poliovirus-Infektion in Suspensions-Kulturen bedeutend schneller verläuft, als in Monolayer-Kulturen. Die Gründe für diese kulturbedingten Unterschiede bei der Infektion des Poliovirus sind bisher unbekannt.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Asynchronität der Poliovirus-Infektion in der BT7-H Zellkultur führte bei den Immunfluoreszenzanalysen dazu, daß zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion innerhalb der Kultur diejenigen Zellen ausgewählt werden konnten, in denen gerade eben das erste Signal des Markers für die Poliovirus-Vesikel detektierbar war. Diese Zellen wurden auch für die entsprechenden Untersuchungen im konfokalen Mikroskop verwendet, da sie die Anfangsstadien der membrangebundenen Replikationskomplexe durch die erste Bildung der Poliovirus-Vesikel repräsentierten.

Auswahl der Marker für die Untersuchung von Kolo-kalisation in der Immunfluoreszenz

Die Auswahl der in den Immunfluoreszenz-Analysen verwendeten viralen und zellulären Marker stellte eine Vorbedingung für die Beantwortung der Frage nach dem Ursprung der Poliovirus-Vesikel dar. Als Marker für die Poliovirus-Vesikel wurde ein Antikörper gegen das PV-Protein 2B verwendet. Es konnte in mehreren früheren Arbeiten gezeigt werden, daß das Protein 2B bzw. dessen Precursor 2BC ausschließlich mit den Membranen der Poliovirus-Vesikel assoziiert ist (Bienz et al., 1987; Bienz et al., 1992, Bienz et al., 1994). Diese Lokalisierung konnte ebenfalls nach der Isolierung einzelner Vesikel-Rosetten bzw. funktioneller Replikationskomplexe (Egger et al., 1996) und mit anderen Einbettungsprotokollen für die Elektronenmikroskopie sowie biochemischen Nachweismethoden (Schlegel et al., 1996) bestätigt werden. Die Proteine 2BC bzw. 2B sind keine klassischen Transmembranproteine, sondern interagieren über amphipathische Helices mit den Membranen der PV-Vesikel (Paul et al., 1994; Barco und Carrasco, 1995; Teterina et al., 1997; Echeverri et al., 1998). Die Lokalisierung des frühestmöglich in der Infektion detektierbaren Signals des anti 2B-Antikörpers in den Immunfluoreszenz-Analysen dieser Arbeit bestätigten die beschriebene Lokalisierung des 2BC bzw. 2B-Proteins in der Wirtszelle (Bienz et al., 1987; Bienz et al., 1992, Bienz et al., 1994). Die runden, punktförmigen Signale des 2B-Markers, die über das ganze Cytoplasma infizierter Zellen verteilt waren, deuteten auf die Lokalisation der 2B-Proteine in den ersten gebildeten Poliovirus-Vesikeln hin.

Um geeignete Marker für die zellulären Kompartimente aus der großen Menge in der Literatur beschriebener Proteine zu finden, mußten bestimmte Kriterien für diese Marker definiert werden. Als Marker für das endoplasmatische Retikulum wurden ausschließlich Transmembranproteine verwendet, da die Präsenz von Membranproteinen die Eigenschaften von Vesikeln und sonstigen zellulären Membranen bestimmt (Elgaard und Helenius, 2001) und daher deren Lokalisierung in der Zelle genau reguliert ist. Zu Beginn dieser Studie wurde davon ausgegangen, daß die Poliovirus-

Vesikel durch einen viralen Mechanismus gebildet werden, der die Funktion des Proteins 2BC involviert (Aldabe und Carrasco, 1995; Bienz et al, 1983; Cho et al., 1994; Suhy et al., 2000; Teterina et al., 2001; Teterina et al., 1997). Da die Sortierung der Membranproteine bei der Bildung der anterograden Transportvesikel auf der Funktion zellulärer Proteine beruht (siehe unten), wurde daher vermutet, daß bei der Bildung der Poliovirus-Vesikel an den potentiellen Donor-Organellen, die spezifischen zellulären Mechanismen der Sortierung und Qualitätskontrolle von Membranproteinen nicht funktionell waren. Aus diesem Grund erschien es wahrscheinlich, daß bei der Bildung der PV-Vesikel die Membranproteine des Donororganells mit in die PV-Vesikel übernommen werden. Dadurch könnte eine Kollokalisierung von zellulären Membranproteinen mit dem Marker für die Poliovirus-Vesikel Hinweise auf den Ursprung der Poliovirus-Vesikel geben. Obwohl sich dies im Verlauf dieser Arbeit als falsch herausstellte, führte es doch zu einer sinnvollen Eingrenzung der Auswahl geeigneter Marker für das ER.

Die weiteren Kriterien waren die möglichst ubiquitäre Lokalisierung des Markers im ER, sowie die Verfügbarkeit eines spezifischen Antikörpers zum Nachweis des Markers. Besonders wichtig war es, daß die ausgewählten Markerproteine keine innerhalb des sekretorischen Transports zyklierenden Proteine darstellten. Solche Proteine sind zwar überwiegend in den Membranen des ER lokalisiert, können aber zum Teil in Transportintermediaten aus dem ER entkommen. Obwohl diese Proteine durch den sogenannten „retrieval“-Mechanismus bald wieder zum ER zurücktransportiert werden, kommt es dadurch doch zur Lokalisation dieser Proteine in Transportintermediaten wie den anterograden Transportvesikeln oder dem ERGIC (Klumperman, 2000). Proteine, die durch einen „retention“- Mechanismus im ER gehalten werden und nur in seltenen Ausnahmefällen aus dem ER heraustransportiert werden, eignen sich besser für die Lokalisierung der ER-Membranen in der Immunfluoreszenz. Nach den Vorversuchen wurden zwei Antikörper gefunden, die die genannten Kriterien erfüllten, der Antikörper gegen das Protein p63 und der Antikörper gegen solubilisierete ER-Membranen (anti MERG). Beide Antikörper stellten die Membranen des ER so deutlich dar, daß sogar im konventionellen Fluoreszenzmikroskop, besonders in der Peripherie der untersuchten Zellen, einzelne Verzweigungen des ER-Netzwerks dargestellt werden konnten. Das Protein p63 ist ein Transmembranprotein und verbindet die Membranen des ER mit den Mikrotubuli des Cytoskeletts (Klopfenstein et al., 2001), weshalb es seit kurzem als CLIMP-63 (für „cytoskeleton linking membrane protein“) bezeichnet wird (Klopfenstein et al., 1998). p63 markiert nicht die Kernmembran der Zelle und es wird vermutet, daß es ein strukturelles Grundgerüst darstellt, an dem, über die Interaktionen mit den Mikrotubuli, das ER in der Zelle fixiert wird (Klopfenstein et al., 2001). Im Gegensatz dazu detektiert der anti MERG-Antikörper ein breites Spektrum an Proteinen der solubilisierten ER-Membranen, die als Antigen bei der Immunisierung von Kaninchen eingesetzt wurden (D. Meyer, persönliche Mitteilungen). Beide Marker detektierten spezifisch die Membranen des ER, was dadurch bestätigt wurde, daß beide die in die ER-Membranen übergehende Kernmembran nicht markierten

und beide in Vorversuchen ein hohes Maß an Kollokalisierung auf den ER-Membranen der BT7-H Zellen zeigten. Die unterschiedliche Spezifität der beiden Antikörper in Bezug auf das Spektrum der detektierten Proteine erwies sich im Verlauf dieser Arbeit als hilfreich für die Untersuchung des Ausschlusses der Membranproteine bei der Vesikelbildung am ER. So konnte geklärt werden, daß nicht nur das einzelne p63-Protein aus den Membranen der Poliovirus-Vesikel ausgeschlossen wird, sondern auch mehrere weitere Proteine, die durch den Marker MERG detektiert wurden.

Der Versuch einen Marker für die Membranen des ER durch Transfektion des 2A-GFP Fusionsproteins des Pflanzenvirus GFLV in die BT7-H Zellen einzuführen, erwies sich als nicht geeignet für die Untersuchung des Ursprungs der Poliovirus-Vesikel. Für das 2A-Protein des GFLV-Virus wurde gezeigt, daß es in Pflanzenzellen ausschließlich an die Membranen des ER bindet (Gaire, 1999). Daher sollte durch die Expression dieses Proteins in Säuger-Zellen zunächst überprüft werden, ob es dort ebenfalls ausschließlich an den ER-Membranen lokalisiert war. Nachdem die Immunfluoreszenzanalyse des 2A-GFP Proteins ein punktförmiges Muster im Cytoplasma der transfizierten HeLa Zellen gezeigt hatte, das nicht der erwarteten Textur des ER entsprach (Abb. 24), wurde zunächst überprüft, ob es durch die Expression des Proteins eventuell zu cytotoxischen Veränderungen in den Zellen gekommen war. Im Elektronenmikroskop wurden deutliche Membranveränderungen des ER transfizierter Zellen beobachtet, die wahrscheinlich auf die Überexpression des 2A-Proteins zurückzuführen waren (Abb. 24). In einer anderen Studie konnte für das membranbindende Protein Cytochrom-b5 in HeLa Zellen gezeigt werden, daß dessen Überexpression zu charakteristischen Membranveränderungen des ER führte (Egger et al., 2000). Die Expression des Poliovirus-Proteins 3AB führte ebenfalls zu Veränderungen der ER-Membranen von transfizierten HeLa-Zellen (Egger et al., 2000). Diese veränderten Membranen konnten nicht für die Bildung von Poliovirus-Vesikeln und damit auch nicht zum Aufbau der Poliovirus-Replikationskomplexe verwendet werden. Außerdem war die Eigenfluoreszenz des 2A-GFP Fusionsproteins in den verschiedenen Experimenten sehr schwach, sodaß es mit einem anti FITC-Alexa488 Konjugat verstärkt werden mußte. Diese Ergebnisse machten es wahrscheinlich, daß die durch die Überexpression von 2A des GFLV veränderten ER-Membranen für die Bildung der Poliovirus-Vesikel ebenfalls nicht mehr verwendet werden konnten. Diese Ergebnisse führten dazu, daß dieser Ansatz in der vorliegenden Arbeit nicht weiter verfolgt wurde.

Für die Auswahl der Marker des Golgi-Apparats wurden auch die schon für die ER-Marker erstellten Kriterien angewendet. Es wurden membranbindende oder Transmembranproteine gesucht, die ausschließlich im Golgi-Apparat vorkommen und für deren Detektion ein spezifischer Antikörper erhältlich war. Zusätzlich wurden Marker bevorzugt, die in den Membranen des cis- und mittleren Golgi-Apparat lokalisiert waren. Der cis- und mittlere Golgi stellen die Bereiche des Golgi-Apparates

dar, in denen die Mehrheit der retrograden Transportvesikel gebildet werden, die Proteine und Membranmaterial zurück in Richtung des ER transportieren (Glick, 2000). Daher stellen der cis- und der mittlere Golgi-Apparat die Bereiche dar, an denen wahrscheinlich die Bildung der Poliovirus-Vesikel stattfindet, falls diese am Golgi-Apparat erfolgen sollte. Weiterhin sind die Membranen des cis und mittleren Golgi-Apparates die Ziele der anterograden Transportcontainer (Vesikel oder VTCs), die dort mit den Golgi-Membranen fusionieren und somit die transportierten Proteine und das Membranmaterial zum Golgi liefern (Bannykh et al., 1998). Die Bereiche des trans Golgi und des TGN („trans Golgi Netzwerk“) sind überwiegend für die Bereitstellung der Transportcontainer verantwortlich, die zu den Endosomen bzw. zur Plasmamembran gebracht werden, also dem anterograden Transport folgen (Glick, 2000).

Durch die Verwendung von Markern für den Golgi-Apparat und eine eventuelle Kolokalisation mit dem Marker für die Poliovirus-Vesikel ließ sich nicht unterscheiden, ob die Poliovirus-Vesikel an den Membranen des Golgi gebildet werden oder mit den Membranen des Golgi fusionieren, jedoch konnten beide Prozesse ausgeschlossen werden, wenn keine Kolokalisation dieser Marker mit PV-2B nachgewiesen wurde. Das Protein Giantin ist ein mit 376 kDa ungewöhnlich großes Protein, das ausschließlich in den Membranen des cis und mittleren Golgi-Apparates vorkommt (Seelig et al., 1994). Giantin ist ein C-terminal in den Membranen des Golgi-Apparat verankertes Protein, das eine ausgesprochen große cytoplasmatische Domäne besitzt, die allein 350 kDa ausmacht (Linstedt und Hauri, 1993). Der zweite in dieser Arbeit verwendete Golgi-Marker, das Protein GM130, ist ein Membranprotein mit mehreren Transmembrandomänen und weist ebenfalls einen großen cytoplasmatischen Teil auf (Nakamura et al., 1995). Beide Proteine sind involviert in die Bindung anterograder Transportintermediate an die Membranen des Golgi-Apparates und ermöglichen wahrscheinlich die Bildung und Fusion von Zisternen und Vesikeln, die für den Transport innerhalb des Golgi-Apparates verantwortlich sind (Linstedt et al., 2000). Da beide Proteine Teil der Bindungs-Maschinerie des Golgi-Apparates für Transportcontainer sind, ist deren stabile Lokalisierung in den Membranen des cis- und mittleren Golgi für den zellulären Transport essentiell. Da Sönnichen et al. (1998) demonstrieren konnten, daß Giantin nach der Inkubation von zellulären Golgi-Fraktionen mit dem stabilen GTP-Analog GTP γ S mit Markern des COPI-Coat in vesikulären Strukturen kolokalisierte, wäre es möglich, daß eine ähnliche Umverteilung des Giantin auch durch die Poliovirus-Infektion induziert werden könnte. Aus diesem Grund wurden die mit dem Giantin-Antikörper erzielten Ergebnisse der Immunfluoreszenz in der vorliegenden Arbeit jeweils durch den Einsatz des GM130-Antikörpers überprüft. Die monoklonalen Antikörper gegen beide Golgi-Membranproteine zeigten zusammen mit dem verwendeten Cy3-Konjugat ein deutliches Signal und niedrige Hintergrundfluoreszenz. Daher waren beide Antikörper für die Beantwortung der Fragestellung nach einer eventuellen Kolokalisation des Markers der Poliovirus-Vesikel mit den Markern für den Golgi-Apparat gut geeignet.

Etablierung und Validierung der konfokalen Mikroskopie, Dekonvolution und 3D-Rekonstruktion

Zur Bestimmung der Herkunft der Poliovirus-Vesikel und des Mechanismus ihrer Bildung wurde die Methode der Dekonvolution von Bildserien des konfokalen Mikroskops und die anschließende 3D-Rekonstruktion verwendet. Mit der mathematischen Methode der Dekonvolution konnte die Qualität der lichtmikroskopischen Bilder und damit deren Aussagekraft erheblich gesteigert werden.

Der Nachteil aller konventionellen lichtmikroskopischen Techniken ist, daß die nicht in der Fokusebene liegenden Bereiche des Präparates die Darstellung der Strukturen in der Fokusebene durch Signale aus den anderen Ebenen des Präparates stören. Dies spielt besonders bei der in dieser Arbeit angewandten Immunfluoreszenz-Detektion von intrazellulären Proteinen (bzw. den damit assoziierten Strukturen) eine Rolle. Die theoretische Auflösungsgrenze in der konventionellen Lichtmikroskopie in der horizontalen Achse beträgt maximal die Hälfte der Wellenlänge des verwendeten Lichts (in diesem Fall ist für die grüne Fluoreszenz von 488 nm die maximale Auflösung ca. 0,25 μm). Die Signale in der Fokusebene des Präparates werden zusätzlich durch die Fluoreszenz von außerhalb der Fokusebene überlagert, außerdem kommt es zu sphärischen und chromatischen Aberationen des Linsensystems des Mikroskops, sodaß die maximale theoretische Auflösung im Normalfall in konventionellen Fluoreszenzmikroskopen nicht erreicht wird (Shaw, 1994). Die Einführung der konfokalen Mikroskopie stellte einen ersten Schritt zur Reduktion der Überlagerung des Signals der Fokusebene durch Signale anderer Ebenen des Präparates dar, konnte aber trotz der weitgehenden Ausblendung des sogenannten „Out of focus blur“ die Artefakte durch die Streufluoreszenz von außerhalb der Fokusebene nicht vollständig eliminieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst versucht, durch einzelne Z-Schnitte nur die markierten Strukturen einer Ebene in der Zelle darzustellen. Die dazu aufgenommenen optischen Einzelschnitte führten allerdings zu widersprüchlichen Ergebnissen bezüglich der Kolokalisation von Markern des ER und der PV-Vesikel. Diese Probleme wurden dadurch verstärkt, daß dabei das komplexe Netzwerk des ER, das eine große Ausdehnung in der Zelle hat, mit den Poliovirus-Vesikeln verglichen wurde, die früh in der Infektion vereinzelt und über die ganze Zelle verteilt vorkommen. Der Ausschluß der ER-Membranproteine aus den PV-Vesikeln führte dazu, daß mit einem optischen Schnitt durch einen Bereich, der Vesikel enthielt, nicht beurteilt werden konnte, ob Kolokalisation der Marker für das ER und für die PV-Vesikel vorhanden war oder nicht. Außerdem lag der Durchmesser der kleinsten PV-Vesikel mit 100 nm (Bienz et al., 1987; Suhy et al., 2000) an der Grenze der Auflösung des konfokalen Mikroskops. Daher konnten mit der konventionellen konfokalen Mikroskopie die Signale der Marker für die Poliovirus-Vesikel und das ER nur unzureichend unterschieden werden. Da die Streufluoreszenz von den Ebenen außerhalb des Fokus durch die herkömmliche konfokale Mikroskopie zwar reduziert aber nicht

eliminiert werden konnten, wurden die mit den Poliovirus-Vesikeln assoziierten 2B-Signale oft durch Streufluoreszenz der Signale der ER-Marker verdeckt. Aus diesem Grund wurde eine weitere Funktion der konfokalen Mikroskopie ausgenutzt: die Möglichkeit Serien von aufeinanderfolgenden optischen Schnitten durch ein Präparat aufzunehmen. Durch die Aufnahme von optischen Schnittserien eines definierten Objekts im konfokalen Mikroskop wurde die Berechnung einer Abbildungsfunktion (Point Spread Function) des verwendeten optischen Systems des Mikroskops möglich (Shaw, 1994). Diese Point Spread Function ermöglicht es wiederum, eine dreidimensionale Rekonstruktion einer Bildserie durch das Präparat zu erstellen, die zu verbesserten Aussagen über die Morphologie der mit den Fluoreszenzsignalen assoziierten Strukturen führt. Die Methode der Dekonvolution ermöglicht aufgrund der berechneten Point Spread Function die mathematische Beschreibung der Darstellung jedes Lichtpunktes eines definierten Präparates in der mikroskopischen Aufnahme. Der umgekehrte Rechenweg führt von der optischen Schnittserie eines unbekanntes Präparates zur Generierung eines entsprechenden Modells, das der Realität bedeutend näher ist, als die Serie der unbearbeiteten optischen Schnitte (Shaw und Rawlins, 1991). Durch den iterativen Prozeß der Dekonvolution wird daher die Auflösung eines konfokalmikroskopischen Bildes erhöht und zwar durch die Reduktion der Fehler des optischen Systems, durch die Reduktion des Hintergrundes und durch die Reduktion des „Out of focus blur“. Die fehlerfreie Erstellung der PSF ist essentiell für die Dekonvolution und stellt daher den für die Optimierung der CLSM-Bilder mit dieser Methode kritischen Schritt dar (Scalettar et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde die PSF für die verwendeten Parameter der Bildaquisition zusammen mit L. Landmann (Anatomisches Institut der Universität Basel, Schweiz) durch die Aufnahme von Präparaten kleiner, fluoreszierender Latex-Kugeln berechnet, da diese Methode die exakteste Bestimmung der PSF ermöglicht (Shaw und Rawlins, 1991). Als Alternative zur Bestimmung der PSF durch die Aufnahme von Latex-Kugeln wurde in der vorliegenden Arbeit auch eine theoretische PSF im Computer berechnet, für die als Berechnungsgrundlage nur die optischen Parameter des Mikroskops verwendet werden (Huygens Manual, 2000). Diese theoretische PSF war daher weniger genau als die durch die Aufnahme der Latex-Kugeln, also experimentell bestimmte PSF. Die experimentell bestimmte PSF ist charakteristisch für das verwendete Linsensystem (Mikroskop) und für die weiteren Aufnahmeparameter wie Brechungsindex des Einbettungsmediums und des Immersionsöls, Dicke des Deckglases usw. Die Qualität der PSF wurde dadurch überprüft, daß mit ihr eine Rückrechnung der für die Bestimmung der PSF verwendeten CLSM-Bildserie der Latex-Kugeln durchgeführt wurde, die zur Erstellung eines optischen Modells der Latex-Kugeln führte. Wenn dieses Modell die reale Form der Latex-Kugeln besser repräsentierte, als die nicht dekonvolvierte Bildserie des CLSM, dann war die Dekonvolution erfolgreich bzw. die errechnete PSF geeignet, um die Abbildungsfehler des optischen Systems zu reduzieren. Diese Methode erlaubte eine

objektive Kontrolle der Qualität der experimentell bestimmten PSF (van der Voort und Strasters, 1995). Das aus der Rückrechnung mit der PSF resultierende Bild der Latex-Kugeln war in der vorliegenden Arbeit deutlich weniger verzerrt und stimmte in allen drei Dimensionen gut mit der sphärischen Form der Latex-Kugeln überein. Nur in der Z-Achse erschienen die sphärischen Latex-Kugeln auch nach der Dekonvolution leicht verlängert. Dies ist ein Phänomen, das durch die vertikale Bewegung des Präparats relativ zur Lochblende bei der Aufnahme der Schnittserien bzw. durch das fehlende Fluoreszenzsignal im Bereich des sogenannten „Missing Cone“ (siehe Kapitel 2.6.) entsteht und sich durch die Dekonvolution zwar reduzieren, aber nicht vollständig eliminieren läßt. Die Überprüfung mit der Dekonvolution des Bildstapels des Präparats der Latex-Kugeln in der vorliegenden Arbeit ergab, daß die experimentell bestimmte PSF frei von Artefakten und der im Computer berechneten theoretischen PSF an Genauigkeit deutlich überlegen war.

Bereits in früheren Studien (Rahner et al., 2000; van der Voort und Strasters, 1995) konnte die Leistungsfähigkeit der Dekonvolution konfokalmikroskopischer Bilder gezeigt werden, dabei wurden insbesondere intrazelluläre Strukturen, die fluoreszenzmarkiert waren, untersucht und die Auflösung der erhaltenen Rohdaten des CLSM durch die Dekonvolution verbessert. Jedoch wurden alle bisher publizierten Untersuchungen an größeren Strukturen, als den in dieser Arbeit untersuchten Poliovirus-Vesikeln, durchgeführt. Bei den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Untersuchungen der Poliovirus-Vesikel wurden erstmals Objekte im CLSM dargestellt und untersucht, die nahe an der Auflösungsgrenze der Lichtmikroskopie liegen, bzw. wurde dessen bisher beschriebene praktikable Auflösung noch gesteigert (Landmann, 2001). Aus diesem Grund war es essentiell für die Aussagekraft der CLSM-Daten, daß diese mit einer zweiten Methode validiert wurden. Ein Vorteil der Untersuchung der Entstehung der Poliovirus-Vesikel durch die konfokale Mikroskopie in dieser Arbeit bestand darin, daß diese bereits im Elektronenmikroskop in ihrer Anordnung, Größe und weiteren morphologischen Charakteristika gut beschrieben waren (Dales et al., 1965; Bienz et al., 1987; Bienz et al., 1992; diese Arbeit). Dieses Wissen war für die Überprüfung der Dekonvolution sehr hilfreich. Die Größe und Morphologie der durch den anti 2B-Antikörper markierten Poliovirus-Vesikel wurden im Anschluß an die Dekonvolution in den MIPs überprüft und stimmten mit den im Elektronenmikroskop gefundenen Poliovirus-Vesikeln überein. Es wurden mit beiden Methoden Vesikeldurchmesser von 100 bis 400 nm gefunden, was ebenfalls mit den zuvor publizierten Größen der Poliovirus-Vesikel korrelierte (Dales et al., 1965; Bienz et al., 1987; Bienz et al., 1992; Bienz et al., 1994; Egger et al., 1996; Suhy et al., 2001). Dabei ist durch die Parameter der digitalen Bilder des konfokalen Mikroskops die Größe der detektierten Strukturen auf Schritte von 50 nm festgelegt. Dies resultiert aus der Größe der Voxel, die bei den Aufnahmen dieser Arbeit 50 x 50 x 100 nm (X x Y x Z) betrug. Nach der Dekonvolution konnte sogar die morphologische Besonderheit der PV-Vesikel in den BT7-H

Zellen verifiziert werden, denn die PV-Vesikel hatten in den 3D-Rekonstruktionen der infizierten Zellen sowohl sphärische als auch tubuläre Morphologie. Damit konnten die Ergebnisse der CLSM-Bilder und der 3D-Rekonstruktion bezüglich der Morphologie der Poliovirus-Vesikel erfolgreich validiert werden.

Diese Validierung war für den Schritt der 3D-Rekonstruktion der CLSM-Aufnahmen durch die Oberflächendarstellung mit dem Isosurface-Modul der Imaris-Software von besonderer Bedeutung. Bei der Erstellung von Isosurface-Modellen der Präparate wurde ein Schwellenwert der Fluoreszenzintensität in beiden Kanälen definiert, der in den Oberflächendarstellungen der 3D-Rekonstruktionen mit dem Isosurface-Modul als Grenze der mit der Fluoreszenz assoziierten Struktur dargestellt wurde (Imaris Manual, 2000). Um die Wahl dieser Schwellenwerte zu objektivieren und zu validieren, wurde die im Teil „Material und Methoden“ dieser Arbeit beschriebene Bestimmung des Anstiegs der Fluoreszenzintensität um Faktor 3 innerhalb von vier Voxeln durchgeführt. Besonders bei der Morphologie der runden Poliovirus-Vesikel und den tubulären ER-Strukturen funktionierte diese Methode gut, denn beide Strukturen wurden gleichmäßig durch die entsprechenden Antikörper markiert (Abb. 18, 22 und 26). Der Anstieg der Fluoreszenzintensität wurde mit der Grenze der assoziierten Struktur gleichgesetzt, die Definition eines Schwellenwertes der Fluoreszenzintensität resultierte also direkt in der Definition der abgebildeten Größe der markierten Struktur. Um diese Vorgehensweise zu validieren, wurde wiederum ein Vergleich mit der Elektronenmikroskopie und mit den zuvor erstellten MIPs der gleichen Aufnahmen durchgeführt. Dabei wurden mit allen Methoden die gleichen Größen der Poliovirus-Vesikel gefunden, was die Auswahl der Schwellenwerte der Fluoreszenzintensität für die Berechnung der 3D-Rekonstruktionen bestätigte (Abb. 32). Im Gegensatz zu den Poliovirus-Vesikeln resultierte die Bestimmung der Größe der COPII-Vesikel mit der 3D-Rekonstruktion in einer deutlichen Abweichung von den bisher publizierten Ergebnissen. Für dieses Phänomen gibt es allerdings eine mögliche Erklärung, auf die in der Diskussion der Größe der Vesikel eingegangen wird. Als Schwellenwert der Fluoreszenzintensität der kolokalisierenden Bereiche bei der 3D-Rekonstruktion konnte nur der Wert 1 gewählt werden, da nach der Definition der Kolokalisation nicht mehr zwischen verschiedenen Ausgangsintensitäten beider Fluorochrome unterschieden werden konnte. Dazu mußte aber zunächst die Kolokalisation, wie im Teil Material und Methoden beschrieben, definiert werden. Die dazu verwendeten statistischen Projektionen der dekonvoluierten Bildserien, die sogenannten Histogramme, erwiesen sich als ein dafür geeignetes, objektives Werkzeug. Zusammen mit den korrespondierenden einzelnen Z-Schnitten und MIPs konnten damit die Werte des Durchblutens beider Kanäle und der Hintergrundfluoreszenz objektiv bestimmt werden. Aus diesem Grund wurden bei jedem dekonvoluierten Bildstapel vor dessen weiterer Bearbeitung die Histogramme beurteilt, da sich durch diese Aussagen über das Durchbluten, den Anteil der Kolokalisation und die allgemeine

Verteilung der Fluoreszenzintensitäten machen ließen. Die Definition der Kollokalisierung in den Histogrammen eignete sich weiterhin zur Darstellung der Strukturen, in denen bestimmte Verhältnisse beider Fluorochrome zueinander vorkamen, da diese als distinkte Pixelpopulationen im Histogramm abgebildet wurden (Demandolx und Davoust, 1995). In den Histogrammen konnten sowohl einzelne Voxelpopulationen auf ihre Lokalisierung im Präparat untersucht werden, als auch durch die Markierung der Werte des Durchblutens und des Hintergrundsignals, die Detektion von falsch-positiver Kollokalisierung weitgehend ausgeschlossen werden. Besonders das Phänomen des Durchblutens ließ sich in den Histogrammen gut bestimmen, da dieses mit der Intensität der Fluoreszenz linear steigt. Falls ein Fluorochrom im Detektionskanal des zweiten Fluorochroms detektiert wurde (durchblutete), so erschien im Histogramm die reine Pixelpopulation dieses Fluorochroms nicht entlang der Achse des 0-Wertes des zweiten Fluorochroms, sondern mit zunehmender Intensität linear von dieser abgelenkt. Bei solchen Bildstapeln wurde der minimale Schwellenwert der Kollokalisierung entsprechend angehoben, um keine falsch-positiv Kollokalisierung zu detektieren (Demandolx et al., 1997). Um das Durchbluten beider Fluorochrome bei gegebenen Einstellungen des konfokalen Mikroskops zu testen, wurden Präparate hergestellt, die ausschließlich mit einem der beiden Fluorochrome gefärbt waren. War in diesen Präparaten bei gleicher Einstellung, wie bei der Bildaquisition kein Signal im zweiten Kanal zu detektieren, waren diese Einstellungen geeignet, um eine simultane Detektion beider Fluorochrome ohne Durchbluten durchführen zu können. Bei den Kontrollen in dieser Arbeit wurden die jeweiligen Präparate mit der intensivsten Markierung und den höchsten detektierten Fluoreszenzintensitäten gewählt und das Durchbluten an diesen beispielhaft bestimmt. Bei den in dieser Arbeit gewählten Aufnahmeparametern kam zu einem maximalen Durchbluten von 17% des roten Fluorochroms in den grünen Kanal und 10% des grünen Fluorochroms in den roten Kanal, das jedoch aufgrund der geringen Intensitäten in den korrespondierenden MIPs nicht dargestellt werden konnte (siehe Teil „Material und Methoden“ und Abb.). Weiterhin erlaubte eine vor Aufnahme von Bildserien neuer Präparate durchgeführte Kontrolle eine schnelle Überprüfung des Durchblutens ohne die Herstellung eines mit nur einem Antikörper und einem Konjugat markierten Präparates. Dazu wurde die Anregungswellenlänge des Argon-Krypton Lasers für einen der beiden Kanäle ausgeschaltet und bei gegebener Anregungsintensität der zweiten Wellenlänge überprüft, ob in dem ersten Kanal ein Signal des zweiten Fluorochroms detektiert werden konnte (Demandolx und Davoust, 1995). War dies nicht der Fall, so konnte Durchbluten unter den geprüften Aufnahmebedingungen ebenfalls ausgeschlossen werden.

Die angewandten Methoden der Dekonvolution und 3D-Rekonstruktion von Bildserien aus dem konfokalen Mikroskop ermöglichten also die Berechnung eines Modells des Präparates, das dessen realer Morphologie bedeutend näher war, als die Darstellung der Rohdaten des konfokalen Mikroskops.

4.2. Poliovirus-Vesikel werden durch den zellulären COPII-Mechanismus an den Membranen des ER gebildet

Texturänderung des ER in der Poliovirus-Infektion

Die konventionelle Fluoreszenzmikroskopie konnte in dieser Arbeit zwar nicht zur Beantwortung der Frage nach dem Ursprung der Poliovirus-Vesikel verwendet werden, ermöglichte jedoch wichtige Aussagen bezüglich der Auswahl geeigneter zellulärer Marker und dem optimalen Zeitpunkt der Infektion für die Untersuchung im CLSM und lieferte durch die Entdeckung der Texturänderung des ER Hinweise auf die Rolle dieses Organells bei der Vesikelbildung. Die Texturänderung des ER in der Infektion ließ vermuten, daß die Membranen des ER in die Bildung der PV-Vesikel involviert sein könnten. Diese Texturänderung trat nur in Zellen auf, die schon ein deutliches Signal des 2B-Markers im Cytoplasma zeigten, also nicht mehr in der Anfangsphase der Infektion waren. In elektronenmikroskopischen Studien konnte zuvor mehrfach demonstriert werden, daß die Zunahme der Menge der PV-Vesikel mit einem Abbau des ER einhergeht, bis dieses schließlich in den späten Phasen der Infektion nicht mehr nachweisbar ist (Bienz et al., 1983; Bienz et al., 1994). Zu den Zeitpunkten der beobachteten Texturänderung des ER wurden in der vorliegenden Arbeit im Elektronenmikroskop Membranen des ER beobachtet, deren Morphologie gegenüber den uninfizierten Zellen unverändert war (Abb. 16 und 17). Besonders zum Zeitpunkt 4.30 hpi konnten in BT7-H Zellen noch ER-Membranen mit intakter Morphologie dargestellt werden, obwohl sich in diesen Zellen bereits eine große Anzahl Poliovirus-Vesikel in diesen Zellen gebildet hatte und in der Immunfluoreszenz bereits eine deutliche Texturänderung des markierten ER nachgewiesen werden konnte. Über die Ursachen der Texturänderung des ER kann nur spekuliert werden. Mit den späteren Experimenten der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, daß die Poliovirus-Vesikel durch die COPII-Proteine an den Membranen des ER gebildet werden. Die große Zahl der Poliovirus-Vesikel, die im Verlauf der Infektion im Cytoplasma akkumulieren, deutet darauf hin, daß ein großer Teil der Membranen des ER in den Poliovirus-Vesikeln aufgeht. Diese Umorganisation der ER-Membranen ist kompatibel mit der beobachteten Texturänderung des durch die verschiedenen Marker visualisierten ER.

Der ebenfalls in der vorliegenden Arbeit gezeigte Ausschluß der Proteine aus den Membranen während der Bildung der Poliovirus-Vesikel führt wahrscheinlich zum veränderten Erscheinungsbild des ER-Netzwerks in der Immunfluoreszenz. Dabei beginnt diese Veränderung offenbar in den perinukleären Bereichen des Cytoplasmas infizierter Zellen, wo auch die Bildung der großen Vesikelfelder in den späteren Phasen der Infektion stattfindet. Die Veränderung der Textur des p63-Signals läßt vermuten, daß die Verankerung der veränderten ER-Membranen an den Mikrotubuli des Cytoskeletts ebenfalls modifiziert wird, da p63 das bislang einzige bekannte Protein ist, das die Membranen des ER mit dem Cytoskelett verbindet (Klopfenstein et al., 2001). Dies könnte eine weitere mögliche Ursache für die beobachtete Texturänderung des Signals der ER-Marker in der

Poliovirus-Infektion sein. Da die Änderung der ER-Textur aber nicht nur für das Protein p63 beobachtet wurde, sondern ebenso für das breite Spektrum der Proteine, die durch den anti MERG Antikörper detektiert wurden, handelt es sich bei diesem Prozeß nicht um ein Phänomen, das auf ein Protein beschränkt ist, sondern wahrscheinlich um eine Veränderung der Membranen des gesamten ER.

Die Ergebnisse der 3D-Rekonstruktion konfokalmikroskopischer Bildserien erklären die Herkunft und Bildung der Poliovirus-Vesikel

Die konfokale Mikroskopie und die 3D-Rekonstruktion führten zur Darstellung der PV-Vesikel an den Membranen des ER. Es wurde beobachtet, daß die Mehrzahl der Poliovirus-Vesikel zu den untersuchten frühen Zeitpunkten der Infektion in Kontakt mit dem ER waren und keine der getesteten ER-Membranproteine auf ihren Membranen aufwiesen. Die Kolo-kalisation des Vesikelmarkers 2B war beschränkt auf die Kontaktstellen der Vesikel mit den ER-Membranen. An vom ER abgelösten Vesikeln waren die getesteten ER-Membranproteine nicht zu detektieren. Die 3D-Rekonstruktionen bestätigten die zuvor für die neu gebildeten Cluster der PV-Vesikel gefundene Lokalisierung in der Nähe der ER-Membranen (Bienz et al., 1987; Abb. 32). Die Experimente anderer Autoren zeigten einzelne Vesikel an den Membranen des ER, die sowohl das PV-Protein 2B trugen und damit als PV-Vesikel identifiziert werden konnten (Bienz et al., 1987). Außerdem konnte durch die gleichen Autoren nachgewiesen werden, daß an den Vesikeln, die kleine Cluster an den Membranen des ER bildeten, RNA-Synthese durchgeführt wurde (Bienz et al., 1987). Diese Ergebnisse sind kompatibel mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, die durch die 3D-Rekonstruktionen der Signale des Poliovirus-Vesikelmarkers und der ER-Marker die Bildung von Vesikel-Clustern an den Membranen des ER zeigen konnten. Jedoch konnte mit den Experimenten der vorliegenden Arbeit und durch die von anderen Autoren publizierten Ergebnisse (siehe oben) nicht geklärt werden, ob das ER tatsächlich der Ursprung der PV-Vesikel ist, da die Momentaufnahme der infizierten Zellen keine Aussage darüber zuläßt, ob die Poliovirus-Vesikel während des Absporens von den ER-Membranen oder während der Fusion mit diesen abgebildet werden. Insbesondere die Tatsache, daß in der vorliegenden Arbeit auf den PV-Vesikeln keine ER-Membranproteine gefunden wurden, ließ keine Rückschlüsse auf einen Ursprung der Vesikel am ER zu. Diese konnten erst mit den Experimenten zum Nachweis der COPII-Marker auf den PV-Vesikeln gemacht werden.

Da die Poliovirus-Vesikel früh in der Infektion an den Membranen des ER dargestellt werden konnten, aber eine Assoziation der Vesikel mit dem Golgi-Apparat sehr selten war, wurde die Präsenz von Markern für anterograde Transportvesikel auf den PV-Vesikeln untersucht. Dazu wurden die Marker für die anterograden Transportvesikel zunächst in uninfizierten BT7-H Zellen

analysiert, um die Methode der konfokalen Mikroskopie und 3D-Rekonstruktion für diese Untersuchungen zu validieren. Mit dieser Methode gelang es, die anterograden Transportvesikel an ihrem Entstehungsort, den Membranen des ER, darzustellen. Wie im Ergebnis-Teil dieser Arbeit beschrieben wurde, erschienen die anterograden Transportvesikel in den uninfizierten im Vergleich zu Poliovirus-infizierten Zellen (3.30 hpi) unverändert. Darüber hinaus konnten keine Unterschiede der Morphologie bei den PV-Vesikeln und den anterograden Transportvesikel in uninfizierten und in Poliovirus-infizierten Zellen gefunden werden. Der einzige detektierbare Unterschied der Poliovirus-Vesikel zu den anterograden Transportvesikeln war, daß die PV-Vesikel schon früh in der Infektion, direkt im Anschluß an ihre Bildung, zu Clustern akkumulierten (Abb. 37).

Aufgrund der Tatsache, daß sich keine morphologischen Unterschiede zwischen anterograden Transportvesikeln und Poliovirus-Vesikeln nachweisen ließen, kann vermutet werden, daß es sich bei den in den Poliovirus-infizierten Zellen beobachteten anterograden Transportvesikeln eventuell um die Poliovirus-Vesikel handeln könnte.

Die Kolokalisation der COPII-Proteine mit dem Protein 2B zeigt, daß die Poliovirus-Vesikel durch den zellulären COPII-Mechanismus gebildet werden

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die konfokale Mikroskopie und 3D-Rekonstruktion gezeigt werden, daß die beiden Bestandteile des COPII-Coat, die Proteine Sec13 und Sec31, vollständig mit dem Marker für die Poliovirus-Vesikel kolokalisieren. Diese Kolokalisation kommt ausschließlich in vesikulären Strukturen vor. Schon zu den frühen Zeitpunkten der Infektion, also nach der Bildung der ersten Poliovirus-Vesikel, ließen sich ausschließlich Poliovirus-Vesikel nachweisen, die neben dem 2B Protein auch die Proteine Sec13 und Sec31 trugen (Abb. 35).

Die zur Bildung von anterograden Transportvesikeln benötigten Proteine des COPII-Coat wurden durch Mutationen in der Hefe *S. cerevisiae* und durch spätere Rekonstitutions-Experimente *in vitro* entdeckt (Baker et al., 1986; Barlowe et al., 1994). Wie bereits beschrieben, ist der Sec13-Komplex, der die Proteine Sec13 und Sec31 enthält, bei der strikt sequentiellen Bindung der COPII an die Membranen des ER, der letzte rekrutierte COPII-Bestandteil (Matsuoka et al., 1998). Der Sec13-Komplex führt die Abschnürung der COPII-Vesikel durch (Springer et al., 1999) und kann seine Funktion nur ausüben, wenn die vorherigen COPII-Bestandteile Sar1 und der Sec23-Komplex (Proteine Sec23 und Sec24) ebenfalls an den ER-Membranen gebunden sind (Matsuoka et al., 1998; Antony et al., 2001). In Rekonstitutionsexperimenten wurde auch gezeigt, daß die späteren Bestandteile des COPII-Coat (Sec23-Komplex und Sec13-Komplex) nicht an Membranen binden können, wenn diese in anderer Reihenfolge, als bei der Bildung der anterograden Transportvesikel zu den Microsomen gegeben werden (Matsuoka et al., 1998). Die COPII-Proteine sind ausschließlich an den Membranen der ERES und der anterograden Transportvesikel konzentriert, gelöst im Cytoplasma liegen diese nur in geringen Konzentrationen vor (Hong, 1998). Aus diesen Gründen

werden die späten COPII-Komponenten Sec13 und Sec31 in der Immunfluoreszenz nur an den Vesikel-Membranen nachgewiesen, wenn Sar1 und der Sec23-Komplex ebenfalls dort vorhanden sind (Lee und Linstedt, 2000).

Da in der vorliegenden Arbeit eine vollständige Kolo-kalisation beider Bestandteile des Sec13-Komplex auf den Vesikeln des anterograden Transports in uninfizierten BT7-H Zellen nachgewiesen werden konnte (Abb. 35), wurden diese zuvor publizierte Ergebnisse für das experimentelle System der BT7-H Zellen bestätigt. Die vollständige Kolo-kalisation der beiden Marker Sec13 und Sec31 mit dem Protein 2B auf den Poliovirus-Vesikeln (Abb. 36) deutet darauf hin, daß auf den Poliovirus-Vesikeln ein vollständiger COPII-Coat vorhanden ist.

Beim Nachweis der Marker der ER-Membranen und der verschiedenen Vesikel wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, daß sich die Morphologie der anterograden Transportvesikel in uninfizierten und in Poliovirus-infizierten BT7-H Zellen nicht von den Poliovirus-Vesikeln unterscheidet (Abb. 30, 31, 34). Dies ist mit den Ergebnissen kompatibel, die die Kolo-kalisation von 2B mit beiden COPII-Markern in PV-infizierten BT7-H Zellen zeigen.

Die Kolo-kalisation beider Marker des COPII-Coat mit 2B auf den Membranen der Poliovirus-Vesikel zeigt daher, daß die Poliovirus-Vesikel durch den COPII-Coat, also homolog zu den Vesikeln des anterograden Transports, gebildet werden.

Die Morphologie der Poliovirus-Vesikel

Die Morphologie der im Elektronenmikroskop detektierten Poliovirus-Vesikel wich in den BT7-H Zellen von den vorher publizierte Poliovirus-Vesikeln in HeLa Zellen ab. In BT7-H Zellen wurden sowohl runde Vesikel, als auch tubuläre Vesikel gefunden, deren Länge oft das doppelte ihrer Breite überstieg (Abb. 16, 17, 21). Dagegen wurden in früher publizierte Arbeiten ausschließlich runde Vesikel beschrieben (Dales et al., 1965; Bienz et al., 1987; Bolten et al., 1998). Da der experimentelle Ansatz dieser Arbeit bezüglich des verwendeten Virusstamms und auch bezüglich der verwendeten Zelllinie von den zuvor publizierte Experimenten abwich, wurde untersucht, was die Ursache für diese geänderte Morphologie der Poliovirus-Vesikel sein könnte. Dazu wurden verschiedene Zelllinien mit zwei verschiedenen Virus-Stämmen infiziert, 3.30 h nach der Infektion fixiert und für die Elektronenmikroskopie eingebettet. Durch diese Experimente wurde demonstriert, daß in HeLa Zellen, die ebenfalls in früheren Versuchen verwendet wurden, durch die Infektion sowohl mit dem Virus-Stamm Mahoney1 als auch mit dem Virusstamm Sabin1, Poliovirus-Vesikel ausschließlich runder Morphologie gebildet wurden. Im Gegensatz dazu wurden in BT7-H Zellen durch die Infektion mit dem Virusstamm Mahoney1, wie auch durch die Infektion mit Poliovirus Sabin1, neben runden PV-Vesikeln auch tubuläre PV-Vesikel gefunden. Daraus konnte abgeleitet werden, daß der infizierte Zelltyp und nicht der

Virus-Stamm für die Ausprägung der unterschiedlichen Vesikelmorphologie verantwortlich ist. In einer weiteren Publikation, in der die mit den BT7-H Zellen verwandte Zelllinie COS1 in der Poliovirus-Infektion eingesetzt wurde, konnte ebenfalls eine teils tubuläre Morphologie der Poliovirus-Vesikel neben den runden PV-Vesikeln beobachtet werden (Suhy et al., 2000), allerdings erwähnen die Autoren dieser Publikation dieses Phänomen nicht. Über die tatsächliche Morphologie aller Poliovirus-Vesikel ließ sich mit der Methode der Elektronenmikroskopie keine direkte Aussage machen, denn durch die Verwendung von Dünnschnitten kann nur jeweils eine Schnittebene durch die Vesikel-Cluster betrachtet werden, in der die Orientierung der Vesikel zufällig ist. Poliovirus-Vesikel, die im EM rund erschienen, könnten also auch tubuläre Vesikel darstellen, die quer geschnitten wurden. Allerdings ist es unwahrscheinlich, daß alle PV-Vesikel in der gleichen Orientierung in der Zelle vorliegen und daher war es besonders bei größeren Vesikel-Clusters möglich, durch die zufällige Orientierung der Vesikel eine näherungsweise Aussage über Morphologie zu erhalten, da diese sowohl quer als auch längs oder diagonal geschnitten wurden. Weiterhin wurde zur Beurteilung der Form der Poliovirus-Vesikel die 3D-Rekonstruktion der dekonvolvierten CLSM-Bilder herangezogen, die das Vorkommen der tubulären und der vesikulären Form der Poliovirus-Vesikel in BT7-H Zellen bestätigte.

Eine Erklärung für die abweichende Morphologie der Poliovirus-Vesikel in den BT7-H Zellen gibt es derzeit nicht. Denkbar wäre jedoch, daß in bestimmten Zellen Mechanismen vorhanden sind, die die Bildung tubulärer Vesikel ermöglichen um bestimmte Proteine zu transportieren, deren Größe über die der normalerweise gebildeten Vesikel hinausgeht. Auf dieses Phänomen wird bei der Diskussion der Größe der anterograden Transportvesikel eingegangen.

Die weiteren morphologischen Charakteristika der in der Elektronenmikroskopie nachgewiesenen Vesikel stimmten mit denen der bisher publizierten Poliovirus-Vesikel überein. Die Poliovirus-Vesikel waren von einer einfachen Membran umgeben, wiesen keine Ribosomen auf und enthielten keine elektronendichten Strukturen. Die bei den eng miteinander assoziierten Poliovirus-Vesikel in BT7-H Zellen nachgewiesenen Fusionsmembranen wurden schon zu Beginn der elektronenoptischen Untersuchungen der Poliovirus-Vesikel beobachtet (Dales et al., 1965). Später wurden diese Fusionsmembranen als Charakteristikum der Poliovirus-Vesikel besonders für deren Detektion im Elektronenmikroskop beschrieben (Bienz et al., 1980; Bienz et al., 1983; Bienz et al., 1987). Die Gründe für diese enge Zusammenlagerung der Poliovirus-Vesikel sind bis heute ungeklärt. Es wurde jedoch vermutet, daß die Bildung der beiden Replikationsformen der Poliovirus RNA, RI und RF zu diesem Phänomen führen könnte (Koch und Koch, 1985). Dies wurde jedoch dadurch widerlegt, daß auch Cluster von Poliovirus-Vesikeln gebildet werden, wenn die virale RNA nicht repliziert wird (Teterina et al., 2001). Neben diesen Einfachmembran-Vesikeln wurden in früheren Studien auch einige wenige Vesikel gefunden, die in ihren Lumina cytoplasmatisches Material aufwiesen, weshalb auf einen autophagischen Prozeß bei der Bildung dieser Population

der Poliovirus-Vesikel geschlossen wurde (Dales et al., 1965). Spätere Arbeiten wiesen auf die Existenz von Doppelmembranvesikeln in der Poliovirus-Infektion hin, was die Vermutung eines autophagischen Prozeß bei der Bildung eines Teils der Poliovirus-Vesikel bestätigte (Schlegel et al. 1996; Suhy et al., 2000). Für diese Untersuchungen wurden Hochdruck-Gefrierung und Gefriersubstitution von Poliovirus-infizierten HeLa-Zellen (Schlegel et al., 1996) oder COS1-Zellen (Suhy et al., 2000) zum Nachweis der Poliovirus-Vesikel 4 h oder 5 h nach der Infektion verwendet und eine immunhistochemische Detektion viraler Proteine an diesen Vesikeln durchgeführt. In der Arbeit von Suhy et al. (2000) sind jedoch zwei elektronenmikroskopische Aufnahmen infizierter Zellen gezeigt, in denen neben den beschriebenen Doppelmembranvesikeln auch eine Vielzahl von Vesikeln mit einfachen Membranen vorkamen, die teils, wie in der vorliegenden Arbeit, tubuläre Morphologie aufwiesen und deren Lumina frei von Cytoplasma war. Trotzdem wurden diese Bilder als Hinweis auf die prädominante Bildung von Doppelmembranvesikeln in der Poliovirus-Infektion gewertet (Suhy et al., 2000). In der Arbeit von Schlegel et al. (1996) konnte 2.30 h nach der Poliovirus-Infektion von HeLa-Zellen nicht eindeutig gezeigt werden, daß es sich bei den Poliovirus-Vesikeln auch früh in der Infektion überwiegend um Doppelmembranvesikel handelte, da die abgebildeten Vesikel weder durch Immunmarkierung noch durch die Bildung von Clusters als Poliovirus-Vesikel identifiziert werden konnten. Im Gegensatz zu den Hinweisen auf Doppelmembranvesikel in den erwähnten Arbeiten, konnten mit verschiedenen Einbettungsmethoden in anderen Arbeiten nur selten Poliovirus-Vesikel mit einer doppelten Membran - insbesondere zu den frühen Zeiten der Infektion - nachgewiesen werden (Bienz et al., 1987; Bienz et al., 1994; Bolten et al., 1998). Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zum Zeitverlauf der Poliovirus-Infektion in BT7-H Zellen der vorliegenden Arbeit unterstützen diese Hinweise, da alle in den infizierten Zellen detektierten Poliovirus-Vesikel einfache Membranen hatten. Ausnahmen davon waren lediglich einzelne Vesikel zu späteren Zeitpunkten der Infektion (4.30 hpi), die eine doppelte Membran aufwiesen. Diese PV-Vesikel mit Doppelmembranen waren jedoch viel seltener in den infizierten Zellen zu detektieren, als die PV-Vesikel mit den einfachen Membranen (vergleiche: Bienz et al., 1994 und Suhy et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden besonders die frühen Zeitpunkte der Poliovirus-Infektion zu Beginn der Bildung der viralen Vesikel untersucht. Zu diesen Zeitpunkten waren ausschließlich Poliovirus-Vesikel mit Einfachmembranen in den infizierten Zellen zu detektieren, die kein cytoplasmatisches Material in ihrem Lumen aufwiesen. Insbesondere der Nachweis einzelner Poliovirus-Vesikel an den Membranen des ER (Bienz et al., 1987) und von Clustern weniger Vesikel, die nach ihrer Bildung am ER akkumulierten und die von einfachen Membranen umgeben waren (diese Arbeit) beweisen, daß dies die vorwiegende Morphologie der Poliovirus-Vesikel darstellt, also die PV-Vesikel nicht primär durch einen autophagischen Prozeß gebildet werden. Für diese Hypothese sprechen eine Reihe weiterer Hinweise: bei Einbettungen mit LR-Gold wie auch mit Epon-Harz wurden überwiegend oder ausschließlich PV-Vesikel mit

einfachen Membranen gefunden (Dales et al., 1965; Bienz et al., 1987; Bienz und Egger, 1995). Die Untersuchung von HEp-2 Zellen und der Vergleich von HEp-2 und HeLa Zellen in Suspensionskulturen und Monolayerkulturen führten ebenfalls zu den frühen Zeitpunkten der Infektion mit Poliovirus zu keinen oder nur sehr wenigen Poliovirus-Vesikeln mit Doppelmembranen (D. Egger und K. Bienz, persönliche Mitteilungen). Ein wichtiger Faktor bei der Darstellung von intrazellulären Strukturen und damit für die Beurteilung der Morphologie der Poliovirus-Vesikel ist das Protokoll der Einbettung der Zellen. Da für die Hochdruck-Frierung und Gefriersubstitution des Einbettungsprotokolls von Schlegel et al. (1996) und Suhy et al. (2000) die Poliovirus-infizierten Zellen in Sucrose-Lösung inkubiert werden mussten, wurde in unserer Arbeitsgruppe die Wirkung dieser Inkubation auf die Poliovirus-infizierten Zellen durch eine anschließende Epon-Einbettung untersucht. Dabei wurde beobachtet, daß die vorherige Inkubation der Poliovirus-infizierten Zellen mit Sucrose zu einer deutlichen Zunahme der Zahl der Doppelmembran-Vesikel führte (D. Egger und K. Bienz, persönliche Mitteilungen). Das bedeutet, daß die von Suhy et al. (2000) und Schlegel et al. (1996) verwendete Einbettungsmethode wahrscheinlich die hauptsächliche Ursache für die verstärkte Bildung von Doppelmembran-Vesikeln in der Poliovirus-Infektion ist.

Bei einem unterschiedlichen Einbettungsprotokoll mit der Verwendung von Gefrierschnitten von Vero-Zellen, die durch - mit Poliovirus verwandten - EMCV infiziert wurden, konnte bei guter Konservierung der zellulären Membranen keine Doppelmembranvesikel detektiert werden (J. Mackenzie, persönliche Mitteilung). Die im Verlauf dieser Arbeit demonstrierte Bildung der Poliovirus-Vesikel durch den zellulären COPII-Mechanismus in den frühen Phasen der Infektion spricht ebenfalls gegen die primäre Bildung von PV-Vesikeln mit Doppelmembranen, da für die homolog gebildeten anterograden Transportvesikel der Zelle bereits früher im Elektronenmikroskop gezeigt werden konnte, daß diese ebenfalls ausschließlich Einfachmembranen besitzen (Balch et al., 1994; Barlowe et al., 1994).

Aufgrund der genannten Hinweise ist der postulierte autophagische Prozeß der Vesikelbildung wahrscheinlich ein sekundäres Phänomen der späten Phasen der Poliovirus-Infektion. In einer jüngeren Arbeit, in der ebenfalls ein autophagischer Ursprung der Poliovirus-Vesikel vermutet wurde (Dodd et al., 2001), gaben die Autoren in der Diskussion an, daß die verwendete Cryo-Einbettung ausschließlich bei Einsatz von COS1-Zellen zu verwertbaren Ergebnissen geführt habe. Da die Versuche der Inkubation infizierter Zellen mit Sucrose zu einer Anreicherung der Doppelmembranvesikel führten, deutet darauf hin, daß das Einbettungsprotokoll der Gefrier-Einbettung die Bildung von Doppelmembranvesikeln verstärkt, die besonders zu den frühen Zeitpunkten der Poliovirus-Infektion sonst nur selten vorkommt.

Damit wird deutlich, daß die Mehrzahl der Poliovirus-Vesikel von einfachen Membranen umgeben ist, bzw. primär in der Poliovirus-Infektion Einfachmembranvesikel gebildet werden.

Die Morphologie der zellulären COPII-Vesikel

Die Größe der in der 3D-Rekonstruktion dieser Arbeit detektierten COPII-Vesikel des anterograden Transports lag sowohl in uninfizierten, als auch in Poliovirus-infizierten BT7-H Zellen mit 100 bis 400 nm deutlich über den bisher für COPII-Vesikel publizierten Werten von 80 bis 100 nm (Barlowe et al., 1994; Schekman und Orci 1996; Matsuoka et al., 1998). Die in der vorliegenden Arbeit dokumentierte Größe der Poliovirus-Vesikel dagegen wurde durch verschiedene Untersuchungen im Licht- und Elektronenmikroskop bestätigt, unter anderem durch verschiedene Einbettungsmethoden für die Elektronenmikroskopie (Bienz et al., 1987, Egger et al., 2000; Suhy et al., 2001). In den früheren Arbeiten und in der vorliegenden Arbeit wurden entweder Poliovirus-infizierte oder 2BC-transfizierte Zellen untersucht und jeweils die gleiche Größe der Poliovirus-Vesikel gefunden. Über die tatsächliche Größe der zellulären COPII-Vesikel hingegen bestehen jedoch unterschiedliche Meinungen in der Literatur. Aufgrund des instabilen COPII-Coat und des schwierigen Nachweises der COPII-Vesikel im Cytoplasma von Zellen wurden die Untersuchungen der Größe der Vesikel an in vitro-rekonstituierten COPII-Vesikeln oder deren Vorstufen ausgehend von Microsomen durchgeführt (Matsuoka et al., 1998; Barlowe et al., 1994). Bezüglich der tatsächlichen Größe der COPII-Vesikel in vivo ist jedoch bisher wenig bekannt. Besonders die Tatsache, daß einige zelluläre Proteine in ihrer transportierten Form die publizierte Größe der COPII-Vesikel von maximal 100 nm bis zu dreifach übersteigen, stellt die ausschließliche Existenz solcher kleinen Vesikel im anterograden Transport in Frage (Bonfanti et al., 1998). So bildet z. B. der Typ 1 des Prokollagens im Lumen des ER ca. 300 nm lange, stäbchenförmige Dreifachhelices, die auch in dieser Form zum Golgi transportiert werden (Bonfanti et al., 1998). Prokollagen wird offenbar in großen, elektronendichten Aggregaten in der Zelle transportiert, die für den Transport dieses Proteins innerhalb des Golgi und vom ER zum Golgi nachgewiesen wurden. Dies spricht gegen die postulierten COPII-Vesikel von 80 bis 100 nm als einzige Form der anterograden Transportcontainer (Bonfanti et al., 1998). Die Möglichkeit, daß für einige Cargo-Proteine spezielle Transportintermediate des anterograden Transports gebildet werden können, schließt die Möglichkeit ein, daß diese speziellen COPII-positiven Strukturen eine von den bisher beschriebenen COPII-Vesikeln abweichende Morphologie und Größe haben könnten (Hong, 1998; Klumperman, 2000). Dies wurde durch Experimente mit dem Protein Pma1p, der ATPase der Plasmamembran der Hefe demonstriert, die in Strukturen transportiert wird, in denen der Sec24-Komplex durch einen homologen Sec24/Lst1p-Komplex ersetzt ist. Die Vesikel, die durch diesen veränderten COPII-Coat gebildet wurden, waren größer als die bisher beschriebenen COPII-Vesikel (Roberg et al., 1999; Shimoni et al., 2000). Es gibt weitere Hypothesen, die besagen, daß neben den beschriebenen, kleinen COPII-Vesikeln andere Strukturen einen Teil des anterograden Transports im sekretorischen Transport übernehmen könnten. Eine dieser Hypothesen besagt, das größere, tubuläre Strukturen am anterograden Transport beteiligt sind, die als „vesicular tubular clusters“

oder VTCs bezeichnet wurden (Presley et al., 1997; Scales et al., 1997; Alvarez et al., 1999; Lavoie et al., 1999). Diese Strukturen haben eine Größe von bis zu 1,5 μm (Presley et al., 1997) und sind positiv für die Marker ERGIC53, COPI (Presley et al., 1997) und COPII (Alvarez et al., 1999). VTCs werden von ihren Entstehungsorten, die über das gesamte Cytoplasma verteilt sind, entlang der Mikrotubuli zu den „microtubuli organising centers“ (MTOC oder Centrosomen) transportiert und akkumulieren in der dortigen Region nahe des Golgi-Apparats (Lippincott-Schwartz, 1998). Die Übergänge zwischen den einzelnen Kompartimenten des anterograden Transport sind allerdings nicht sicher bekannt. Insbesondere ist ungeklärt, ob die VTCs ein eigenständiges zelluläres Kompartiment darstellen, denn es wurden im Elektronenmikroskop direkte Verbindungen der VTCs sowohl mit dem ER (Hauri und Schweizer, 1992; Krijnse-Locker et al., 1994; Stinchcombe et al., 1995) als auch mit dem cis-Teil des Golgi-Apparats (Tang et al., 1993; Griffiths et al., 1994) gefunden. Sicher ist, daß der erste Schritt des anterograden Transports in COPII-positiven Strukturen stattfindet und es ist wahrscheinlich, daß die Mehrzahl dieser COPII-positiven Strukturen Vesikel von 80 bis 100 nm sind. Es ist bisher nicht bekannt, in wie weit die anterograd transportierten Cargo-Proteine eine Rolle bei der Ausprägung der Morphologie der Transportcontainer spielen, denn es konnte gezeigt werden, daß verschiedene Cargo-Proteine die Vesikelbildung am ER modulieren können, indem z.B. die Rate der Bildung von COPII-Vesikeln durch diese variiert wird (Aridor et al., 1999). Es wäre entsprechend vorstellbar, daß die Rekonstitutionsexperimente mit Microsomen, die keine spezifischen Cargo-Proteine besitzen, zu einer einheitlichen Form und Größe der COPII-Vesikel führen, die jedoch in vivo variabler sind, als bei der Bildung an den Microsomen der in vitro-Experimente. Die zweite Möglichkeit zur Erklärung der unterschiedlichen Größe der COPII-Vesikel in der 3D-Rekonstruktion ist die Tatsache, daß in der lichtmikroskopischen Darstellung von Immunfluoreszenz-Markierungen die Größe der markierten Strukturen nicht unbedingt ihre tatsächliche Größe widerspiegelt (Scales et al., 1997). Das würde bedeuten, daß in der 3D-Rekonstruktion die markierten COPII-Vesikel bis zu dreifach größer dargestellt werden würden, als in der Realität. Dieser deutliche Unterschied bzw. eine solche Ungenauigkeit der Methode ist aber unwahrscheinlich, wenn man betrachtet, daß für die Poliovirus-Vesikel mit dieser Methode die gleiche Größe gefunden wurde, wie in der Elektronenmikroskopie (Abb. 32). Unbestritten ist hingegen, daß die Auflösung der konfokalen Mikroskopie auch nach der 3D-Rekonstruktion nicht die Werte der Elektronenmikroskopie erreicht. Dies zeigt der Vergleich der Vesikel-Clusters mit beiden Methoden in dieser Arbeit. Besonders, wenn in den 3D-Rekonstruktionen die immunmarkierten Strukturen eng miteinander assoziiert sind, ist es schwierig, diese voneinander zu unterscheiden. Jedoch wird aus dem Vergleich beider Methoden auch deutlich, daß anhand der im Isosurface abgebildeten Oberflächen dieser Strukturen die Zahl der Vesikel pro Cluster abgeschätzt werden kann und daher indirekt auf die Größe der Vesikel im Cluster geschlossen werden kann (Abb. 32).

Aus diesen Gründen ist es wahrscheinlich, daß die in der vorliegenden Arbeit mit der 3D-Rekonstruktion konfokalmikroskopischer Bildserien detektierten anterograden Transportvesikel tatsächlich größer sind, als die in den bisherigen in vitro-Experimenten beschriebenen COPII-Vesikel.

4.3. Ausschluß von ER-Membranproteinen aus anterograden Transportvesikeln und Poliovirus-Vesikeln

Sowohl an den Membranen der Poliovirus-Vesikel als auch der anterograden Transportvesikel der uninfizierten Zellen wurden keine der gesteteten ER Membranproteine gefunden. Für die Poliovirus-Vesikel war schon seit längerer Zeit bekannt, daß an deren Membranen verhältnismäßig geringe Mengen an Proteinen vorhanden sind, da diese schwierig für die Elektronenmikroskopie zu fixieren sind (Bienz et al., 1987). In jüngeren Arbeiten wurde demonstriert, daß einige der in den ER-Membranen lokalisierten zellulären Proteine nicht in den Membranen der Poliovirus-Vesikel vorhanden waren (Suhy et al. 2000). Dabei wurde sowohl in Zellfraktionierungen als auch durch ultrastrukturelle Analyse Poliovirus-infizierter Zellen im Elektronenmikroskop keine Assoziation des ER-Markers p63 mit den Poliovirus-Vesikeln gefunden. Diese Ergebnisse stehen jedoch im Gegensatz zu den zuvor von der gleichen Arbeitsgruppe publizierten Arbeiten, die in biochemischen Untersuchungen von Zellfraktionen, die Poliovirus-Vesikel enthielten, eine Kopräzipitation des PV-Vesikelmarkers 2B mit den Markerproteinen des ER, des Golgi-Apparats und der Lysosomen nachweisen konnten (Schlegel et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit konnte durch die konfokale Mikroskopie der Ausschluß der ER-Membranproteine aus einzelnen Poliovirus-Vesikeln während ihrer Bildung durch den COPII-Coat am ER nachgewiesen werden. Entgegen der Arbeitshypothese zu Beginn dieses Projekts konnte also durch den Nachweis von Markern der Zellorganellen ER und Golgi-Apparat auf den Poliovirus-Vesikeln der Ursprung dieser Vesikel nicht überprüft werden. Die Tatsache, daß sowohl an den Poliovirus-Vesikeln als auch an den anterograden Transportvesikeln uninfizierter und Poliovirus-infizierter Zellen keine der gesteteten ER-Membranmarker nachgewiesen werden konnten, deutete auf einen ähnlichen Mechanismus der Sortierung der Proteine bei der Bildung der Vesikel durch den COPII-Coat hin, bei der durch spezifische Interaktionen der Proteine des ER und des COPII-Coats bei der Vesikelbildung genau zwischen zu transportierenden Proteinen (= Cargo-Proteine) und den im ER verbleibenden Proteinen (=ER-Proteine) unterschieden wird. Dabei werden ausschließlich Cargo-Proteine in denn ERES konzentriert und in die COPII-Vesikel verpackt (Ellgaard und Helenius, 2001; Klumpermann, 2000). Cargo-Proteine können sowohl Membranproteine darstellen, als auch luminal Proteine, die durch die Interaktion mit membrangebundenen Cargo-Rezeptoren in die anterograden Transportvesikel verpackt werden.

Im endoplasmatischen Retikulum gibt es verschiedene Prozesse der Qualitätskontrolle von Proteinen, die dem sekretorischen Transportweg folgen. So führen die Interaktionen mit

Chaperonen zur Erkennung von unvollständigen oder fehlerhaften Proteinen, die entweder kotranslational auf der Ebene der unreifen Polypeptide oder posttranslational bei fertig synthetisierten Proteinen stattfinden kann (Elgaard und Helenius, 2001). Der letzte und wichtigste Prozeß der Selektion der transportierten Proteine findet jedoch bei der Inkorporierung dieser Proteine in die anterograden Transportvesikel an den ERES der ER-Membranen statt, bei dem sowohl die Proteine, die nicht transportiert werden, als auch fehlerhafte Cargo-Proteine aussortiert werden (Elgaard und Helenius, 2001).

Für einen Ausschluß von ER-Membranproteinen aus anterograden Transportvesikeln gab es bereits in früheren Arbeiten mehrere Hinweise. So konnten Schweizer et al. (1995) in einer Publikation, die zuvor gewonnene Ergebnisse über die zelluläre Lokalisierung des Proteins p63 korrigierte, zeigen, daß p63 ausschließlich in den Membranen des ER vorkommt, es deutlich mit dem zuvor beschriebenen ER-Marker PDI, aber nicht mit dem ERGIC-Marker ERGIC53 kolokalisiert. Für weitere Proteine konnte ein Ausschluß aus anterograden Transportvesikeln ebenfalls gezeigt werden, so z.B. durch Rekonstitutions-Experimente an Microsomen, durch die demonstriert wurde, daß sec61, BIP und Shr3 nicht in die durch die COPII-Proteine gebildeten anterograden Transportvesikel übernommen werden (Kuehn et al., 1998). Ebenfalls durch die in vitro-Rekonstitution der COPII-Vesikelbildung an Microsomen wurde bewiesen, daß das Protein Sec12, das die Sar1-GTPase aktiviert, nicht in die anterograden Transportvesikel übernommen wird, sondern an den Membranen des ER verbleibt (Campbell et al., 1997). Mit einer Mutante von Sar1, die den COPII-Coat stabilisierte, weil sie keine GTPase-Aktivität aufwies, wurden weitere in vitro-Rekonstitutions-Versuche zur Bildung von COPII-Vesikeln an Microsomen durchgeführt (Aridor et al., 1998). Die Autoren dieser Studie demonstrierten durch Immunhistochemie, Zellfraktionierung und Western-Blots, daß die ER-Proteine Calnexin, BIP und RibophorinII nicht in anterograde Transportvesikel übernommen werden. Als Kontrolle diente in diesen Versuchen das Glykoprotein des vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G), das in transfizierten und in VSV-infizierten Zellen dem anterograden Transportweg folgt (Lodish et al., 1983; Schwaninger et al., 1991; Plutner et al., 1992) und das ebenfalls in die detektierten sogenannten „pre budding“-Komplexe an den Microsomen-Membranen übernommen wurde (Aridor et al., 1998). „Pre budding“-Komplexe sind Vorwölbungen der Microsomenmembranen, die als Vorstufe zur Bildung der COPII-Vesikel entstehen. Durch die Zugabe von Sar1 und Sec23 bzw. Sec24, aber nicht des Sec13-Komplexes, zu den Microsomen konnte die Bildung der Vesikel nach der Rekrutierung des Sec23-Komplexes unterbrochen werden. Dadurch wurde der Zustand der Membranvorwölbungen stabilisiert, da das Ablösen der Vesikel von den Membranen durch das fehlende Sec13-Komplex nicht stattfinden konnte (Aridor et al., 1998). Damit konnte die Präsenz von Proteinen in diesen Vorstufen der Vesikelbildung untersucht werden und es wurde gezeigt, daß die COPII-Proteine Sar1 und Sec23 bzw. Sec24 direkt mit Cargo-Proteinen interagieren und durch diese Interaktionen

die Sortierung der Cargo-Proteine in die anterograden Transportproteine durchgeführt wird (Aridor et al., 1998). Damit wurde die zuvor aufgestellte Hypothese bestätigt, daß die COPII-Proteine an den ER-Membranen direkt mit den Cargo-Proteinen interagieren und dadurch die Selektion der Proteine ermöglichen (Aridor und Balch, 1996). Damit wurde bewiesen, daß diese frühen COPII-Bestandteile für die Sortierung der Proteine bei der Vesikelbildung verantwortlich sind, diese also zu einem genau definierten Zeitpunkt der Vesikelbildung zwischen dem Schritt der Aktivierung von Sar1 und dem Abschnüren der Vesikel von der ER-Membran stattfindet. Bereits durch diese Versuche wurde auf eine mögliche Funktion des Sar1 beim Prozeß der Proteinsortierung des anterograden Transports hingewiesen (Aridor et al., 1998), es konnte jedoch nicht genau zwischen der Funktion der Proteine Sar1 und Sec23/24 unterschieden werden. Durch weitere Experimente, in denen das artifizielle Cargo-Protein VSV-G in der synchronisierten Bildung von anterograden Transportvesikeln durch isolierte COPII-Bestandteile eingesetzt wurde, konnte die Funktion der einzelnen COPII-Proteine untersucht werden (Aridor et al., 2001). Dabei wurden Intermediate der Vesikelbildung in Form von tubulären Strukturen an den Membranen beobachtet, die ausschließlich Sar1 und Cargo-Proteine enthielten. Es wurde gezeigt, daß sowohl die tubulären Domänen des ER, als auch die Konzentration der Cargo-Proteine erst stattfinden können, wenn aktiviertes, also mit GTP besetztes, Sar1 an den Membranen gebunden ist. Weiterhin konnte eine direkte Interaktion von Sar1 mit dem VSV-G Protein nachgewiesen werden (Aridor et al., 2001). Die durch Sar1 und die Cargo-Proteine gebildeten tubulären Domänen wurden wie die anterograden Transportvesikel nach der Zugabe aller COPII-Proteine (Sec23- und Sec13-Komplex) von den Membranen des ER abgeschnürt und konnten die Cargo-Proteine zu den VTCs transportieren. Die nachgewiesenen tubulären Domänen waren also funktionelle Zwischenstufen bei der Bildung von COPII-Vesikeln. Diese Ergebnisse zeigten, daß das Protein Sar1 für die Selektion der Cargo-Proteine bei deren Inkorporation in die COPII-Vesikel verantwortlich ist. Daraus ergibt sich eine doppelte Funktion dieses Proteins, neben der Stimulation der Bindung der späteren COPII-Proteine zur Bildung der anterograden Transportvesikel, ist es auch für die Selektion der transportierten Cargo-Proteine während diesem Prozeß verantwortlich.

Das Vorkommen von direkten Interaktionen der COPII-Proteine mit Cargo-Proteinen wurde ebenfalls durch Versuche demonstriert, mit denen nachgewiesen wurde, daß VSV-G als Cargo-Protein regulatorische Wirkung auf die Bildung von COPII-Vesikeln ausüben kann, indem es mit den Proteinen Sar1, Sec23 und Sec24 interagiert (Aridor et al., 1999).

Der Ausschluß von ER-Membranproteinen aus den Transportintermediaten bzw. das Zurückhalten dieser Proteine im ER und die selektive Aufnahme von Cargo-Proteinen in die anterograden Transportvesikel ist ein Hinweis auf die effizienten Regulationsmechanismen, die in der Zelle für die exakte Verteilung der Proteine in den verschiedenen Kompartimenten sorgen (Ellgaard und Helenius, 2001). Der beobachtete Ausschluß der ER-Membranproteine bei der Bildung

der Poliovirus-Vesikel an den Membranen des ER zeigt, daß bei der Bildung der Poliovirus-Vesikel die Mechanismen der Sortierung zellulärer Proteine an den Membranen des ER intakt sind. Die funktionelle Selektion der ER-Membranproteine bei der Bildung der Poliovirus-Vesikel unterstützt damit die Ergebnisse der Kolo-kalisation der COPII-Marker mit dem viralen Protein 2B auf den Poliovirus-Vesikeln, die demonstrierten, daß die Bildung der Poliovirus-Vesikel homolog zur Bildung der zellulären COPII-Vesikel verläuft.

4.4. Ist der zelluläre COPII-Coat auf den Membranen der Poliovirus-Vesikel vollständig und funktionell?

Durch die sequentielle Bindung des COPII-Coats an die ER-Membranen ließen sich durch die Detektion einzelner Proteine dieses Komplexes Hinweise auf die Präsenz des gesamten COPII-Coats auf den Membranen der Poliovirus-Vesikel erhalten. Die späteren COPII-Proteine können nur dann an die ER-Membranen binden, wenn die vorherigen bereits an diesen Membranen vorhanden sind. Die feste Abfolge bei der Bindung der COPII-Proteine an die ER-Membranen ist also eine Voraussetzung für die Vesikelbildung (Salama et al., 1993; Antonny et al., 2001). Nach der Aktivierung des Sar1 (Austausch des GDP gegen GTP) durch das ER-Membranprotein sec12, werden zunächst die Proteine Sec23 und Sec24 (zusammen als Sec23-Komplex) an die Membranen rekrutiert. Die folgende Bindung der Proteine Sec13 und Sec31 (als im Cytoplasma vorgeformter Sec13-Komplex) führt dann zum Abschnüren der neu gebildeten Vesikel (Salama et al., 1993; Kreis und Pepperkok, 1994). Da Sec13 und Sec31 nicht ohne die Bindung der vorherigen Komponenten des COPII-Coat an die Membranen binden können, konnte in der vorliegenden Arbeit angenommen werden, daß bei der Präsenz des Sec13-Komplex auf den Membranen der Vesikel, der COPII-Coat vollständig und funktionell war (Salama et al., 1993; Kreis und Pepperkok; 1994; Tang et al., 1997; Springer et al., 1999; Wieland und Harter, 1999). Es konnten in der vorliegenden Arbeit beide Proteine des Sec13-Komplex (also Sec13 und Sec31) sowohl auf den Membranen der anterograden Transportvesikel uninfizierter Zellen als auch auf den Poliovirus-Vesikeln detektiert werden. Aus diesen Ergebnissen ließ sich ableiten, daß die Bildung der Poliovirus-Vesikel durch den vollständigen und funktionellen COPII-Coat durchgeführt wird.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit führten zur Vermutung, daß das Protein Sar1 nicht auf den Membranen der Poliovirus-Vesikel vorhanden ist, sondern bei deren Bildung eventuell durch das virale Protein 2BC ersetzt werden könnte. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit konnte ein hoher Grad der Kolo-kalisation des Markers für die Poliovirus-Vesikel mit den Markern des COPII-Coats nach der Poliovirus-Infektion und der Expression des Proteins 2BC nachgewiesen werden. Dagegen wurden einige wenige Strukturen in der Zelle detektiert, die das virale 2B-Protein aber keine COPII-Markierung aufwiesen (Abb. 36). Diese Strukturen waren in den meisten Fällen im direkten Kontakt mit den Poliovirus-Vesikeln und hatten eine überwiegend

tubuläre, seltener vesikuläre Morphologie. Die tubulären Strukturen, die ausschließlich durch den Antikörper gegen das virale Protein 2BC markiert wurden, stellen wahrscheinlich Membranbereiche des ER dar, in denen das 2BC-Protein bereits konzentriert wurde, an denen aber noch keine Poliovirus-Vesikel gebildet wurden. Diese Annahme wurde durch die Beobachtung bestätigt, daß auf den Membranen des ER flache Bereiche vorkommen, an denen das 2BC-Protein mit den ER-Membranproteinen kolokalisiert, aber noch keine Vesikel vorhanden sind (Abb. 30 und 31). Die viralen Proteine werden also wahrscheinlich noch vor der Rekrutierung des COPII-Coat an den Membranen des ER konzentriert. Falls das Protein 2BC wie ein Cargo-Protein funktioniert, könnte es durch die Interaktionen mit den COPII-Proteinen, die Bildung von COPII-Vesikeln stimulieren. Eine solche Regulation der Bildung von COPII-Vesikeln wurde bereits für das Cargo-Protein VSV-G gezeigt (Aridor et al., 1999). Die Funktion der Bereiche, in denen das Poliovirus-Protein 2BC konzentriert wird, könnte der Funktion der ER exit sites („ERES“) entsprechen, an denen die anterograden Transportvesikel der uninfizierten Zellen gebildet werden (Tang et al., 2001). Die typische Kolokalisation von YIP1 und den Bestandteilen des COPII-Coat, die durch Tang et al. (2001) beschrieben wurde konnte in der vorliegenden Arbeit für uninfizierte BT7-H Zellen bestätigt werden (Abb. 42).

Diese deutliche Kolokalisation war ebenfalls für die Marker YIP1 und PV-2B erwartet worden, da die COPII-Bestandteile Sec13 und Sec31 eine deutliche Kolokalisation mit dem 2B-Marker auf den Poliovirus-Vesikeln aufwiesen (Abb. 36). Aus diesem Grund wurde davon ausgegangen, daß die PV-Vesikel in Analogie zu den anterograden Transportvesikeln ebenfalls an den ERES gebildet würden. Die erwartete Kolokalisation von 2B und YIP1 war aber in den Poliovirus-infizierten Zellen nur schwach ausgeprägt und die Signale beider Marker lagen weitgehend getrennt vor (Abb. 42).

Wie bereits beschrieben, wird das Protein YIP1a nicht mit in die COPII-Vesikel übernommen, sondern verbleibt in den Membranen des ER (Tang et al., 2001). Die Proteine des COPII-Coat sind ebenfalls instabil an die Membranen der anterograden Transportvesikel gebunden und dissoziieren bald nach der Bildung der Vesikel (Antony et al., 2001). Wahrscheinlich werden aus diesem Grund in der Immunfluoreszenz keine anterograden Transportvesikel in den uninfizierten Zellen dargestellt, die nur positiv für COPII-Proteine sind, aber kein YIP1a-Signal aufweisen (Abb. 42).

Im Gegensatz zu den anterograden Transportvesikeln der uninfizierten Zellen ist auf den Poliovirus-Vesikeln der COPII-Coat wahrscheinlich stabilisiert. Da die Poliovirus-Vesikel nach ihrer Bildung am ER akkumulieren, kann auf diesen aufgrund des stabileren COPII-Coat auch noch längere Zeit nach ihrer Bildung der COPII-Coat mit Antikörpern in der Immunfluoreszenz detektiert werden. Da jedoch YIP1a, wie auch die ER-Membranproteine, aus den Membranen der COPII-Vesikel ausgeschlossen wird und die Prozesse der Sortierung der Membranproteine

bei der Bildung der Poliovirus-Vesikel funktionell sind, kommt es wahrscheinlich auch zum Ausschluß des YIP1a von den Membranen der Poliovirus-Vesikel. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit nur wenig Kolo-kalisation von YIP1a mit 2B in den Poliovirus-infizierten Zellen detektiert. Eine zweite mögliche Interpretation der Ergebnisse mit dem YIP1a-Marker in den Poliovirus-infizierten Zellen wäre die Tatsache, daß es zur Konzentration der viralen Proteine an den Orten ihrer Synthese kommt. Aus diesem Grund könnte die Bildung der Poliovirus-Vesikel an anderen Bereichen der ER-Membranen durchgeführt werden als den ERES, an denen die Bildung der anterograden Transportvesikel stattfindet. Diese Hypothese läßt sich jedoch mit den in der vorliegenden Arbeit angewandten Methoden nicht überprüfen. Außerdem ist bisher noch nicht bekannt, ob die Bildung der Poliovirus-Vesikel an präferentiellen Stellen der ER-Membran stattfindet. Die Unterschiede in der Lokalisation von YIP1a auf den Membranen der anterograden Transportvesikel und der Poliovirus-Vesikel entstehen daher wahrscheinlich durch die Stabilisierung des COPII-Coat auf den Poliovirus-Vesikeln.

Die wenigen vesikulären Strukturen, die nach der Poliovirus-Infektion gefunden wurden und ausschließlich Signal des 2B-Markers, jedoch kein Signal der getesteten COPII-Proteine trugen, lassen sich ebenfalls durch die in der vorliegenden Arbeit angewandten Methoden nicht zweifelsfrei klären. Diese vesikulären Strukturen könnten entweder Poliovirus-Vesikel darstellen, die ihren COPII-Coat nach der Bildung verloren haben, oder eine Minderheit von Poliovirus-Vesikeln repräsentieren, die durch einen anderen, als den COPII-Mechanismus gebildet wurden. In dieser Arbeit konnte kein anderes Kompartiment als Ursprung der Poliovirus-Vesikel identifiziert werden, als das ER. Allerdings wurde sehr selten eine Kolo-kalisation des 2B-Markers mit den Markern des Golgi-Apparates detektiert (Abb. 33). Die Möglichkeit, daß die wenigen Vesikel, die keine COPII-Proteine enthielten, aus dem Golgi stammen, kann daher nicht ausgeschlossen werden. Die Tatsache, daß die COPII-Proteine auf der großen Mehrheit der Poliovirus-Vesikel vorhanden sind und eine Vielzahl der Poliovirus-Vesikel in den frühen Phasen der Infektion an den Membranen des ER lokalisiert sind, läßt diese Möglichkeit für die frühen Zeitpunkte der Infektion allerdings unwahrscheinlich erscheinen. Es ist jedoch möglich, daß zu den späteren Zeiten der Infektion auch andere zelluläre Membranen sekundär in die Bildung der Poliovirus-Vesikel involviert werden. Da der zelluläre COPII-Coat durch das Poliovirus-Protein 2BC wahrscheinlich auf den COPII-Vesikeln stabilisiert wird (siehe unten), ist es ebenfalls unwahrscheinlich, daß diese Vesikelpopulation durch den COPII-Coat gebildet wurde, diesen aber bereits verloren hat. Trotzdem kann auch diese Möglichkeit durch die Experimente dieser Arbeit nicht ausgeschlossen werden. Da die Poliovirus-Vesikel, an denen keine COPII-Proteine detektiert werden konnten, nur in sehr geringer Anzahl in den Poliovirus-infizierten und 2BC-transfizierten Zellen vorkamen, spielen diese für die Replikation des Poliovirus wahrscheinlich keine essentielle Rolle.

4.5. Mögliche Funktionen des viralen Proteins 2BC bei der Bildung der Poliovirus-Vesikel

Die Ergebnisse früherer Arbeiten zeigten, daß bei der alleinigen Expression des Poliovirus-Proteins 2BC, Vesikel gebildet werden, die sich morphologisch nicht von denen der Poliovirus-Infektion unterscheiden (Aldabe und Carrasco, 1995; Bienz et al., 1983; Cho et al., 1994). In dieser Arbeit wurde demonstriert, daß diese Vesikel nach der 2BC-Expression - wie auch bei der Infektion mit Poliovirus - durch den zellulären COPII-Coat gebildet werden. Dies läßt auf zwei verschiedene Möglichkeiten der Funktion von 2BC in diesem Prozeß schließen. Die erste Möglichkeit ist, daß Poliovirus als „Priming-Protein“ bei der Bildung des COPII-Coat wirken könnte. Priming-Proteine sind meist Membranproteine, die mit Sar1 und eventuell mit dem Sec23-Komplex interagieren können (z.B. vSNAREs) und somit die Bildung des COPII-Coat stimulieren bzw. regulieren können (Hong et al., 1998; Springer et al., 1999). Diese Membranproteine des ER können entweder membrangebundene Cargo-Proteine sein, die in die Membranen der Vesikel übernommen werden, oder membrangebundene Cargo-Rezeptoren, die durch Interaktionen mit luminalen Cargo-Proteinen die Aufnahme dieser Proteine in die Transportvesikel sicherstellen (Springer et al., 1999). 2BC könnte ein solches Priming-Protein für die Vesikelbildung darstellen und somit regulierende Funktion bei diesem Prozeß ausüben. Hinweise für eine Regulation der Vesikelbildung durch inkorporierte Cargo- oder Priming-Proteine wurden bereits gefunden (Aridor et al., 1998; 1999; Springer et al., 1999; Aridor et al., 2001) und sprechen für die Hypothese dieser Funktion von 2BC. Um diese Aufgabe zu erfüllen, müßte das Protein 2BC mit den Bestandteilen des COPII-Coat interagieren. Eine solche Interaktion konnte bisher zwar noch nicht gezeigt werden, derzeit werden aber Versuche in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt, um diese Frage zu beantworten. Die zweite Erklärungsmöglichkeit für die Funktion des Proteins 2BC ergibt sich aus der Tatsache, daß nach der Rekonstitution der Vesikelbildung an Microsomen mit isolierten COPII-Komponenten im Elektronenmikroskop wenige Vesikel gefunden wurden, die einen COPII-Coat trugen, an denen jedoch kein Sar1-Protein gefunden wurde (Barlowe et al., 1994). Dieses Phänomen konnte bisher nicht erklärt werden, es liegt jedoch nahe, daß entweder das Sar1 schneller als die restlichen COPII-Proteine nach der Bildung der anterograden Transportvesikel dissoziiert, oder das Sar1 bei der Bildung dieser Population der COPII-Vesikel nicht an den Membranen der ERES vorhanden war. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, daß Sar1 unter Umständen bei der Bildung der COPII-Vesikel durch ein anderes Protein ersetzt werden könnte. In der Poliovirus-Infektion könnte das virale 2BC-Protein das Sar1 ersetzen, wofür eine Reihe von Charakteristika des Proteins 2BC spricht. Zunächst besitzt 2BC - wie Sar1 auch (Yoshihisa et al., 1993; Barlowe et al., 1994) - eine NTPase-Aktivität (Pfister und Wimmer, 1999). Diese NTPase-Aktivität des 2BC stellt vornehmlich eine ATPase-Aktivität dar, denn es wurde gezeigt, daß 2BC neben ATP auch GTP bindet, dies aber nicht spalten kann (Pfister und Wimmer, 1999). Dieses Charakteristikum liefert ebenfalls eine

attraktive Möglichkeit zur Erklärung der Akkumulation der PV-Vesikel in der Infektion (siehe unten). Weiterhin spricht für eine Substitution des Sar1 durch 2BC, daß 2BC nur über amphipatische Helices mit den Membranen assoziiert ist und nicht ein Membranprotein mit Transmembrandomänen darstellt (Paul et al., 1994; Barco und Carrasco, 1995; Echeverri und Dasgupta, 1995; Teterina et al., 1997; Echeverri et al., 1998). Sar1 ist im inaktiven Zustand ein lösliches Protein, das nur durch die Aktivierung (also den Austausch von GDP zu GTP) an die Membranen des ER gebunden wird (Kuge et al., 1994). Die Assoziation des Sar1 und des 2BC mit den ER-Membranen folgt also ähnlichen Prinzipien. Kürzlich konnte für die Bildung der zellulären anterograden Transportvesikel gezeigt werden, daß dort ein ATP-abhängiger Schritt bei der Aktivierung des Sar1 eine Rolle spielt (Aridor et al., 2001). Dabei handelt es sich um den Austausch von GDP zu GTP an Sar1 durch das ER-Membranprotein Sec12, der durch eine bislang unbekannte Proteinkinase in ATP-Abhängigkeit reguliert wird (Aridor et al., 2001). Da das Protein 2BC eine ATPase-Funktion hat (Pfister und Wimmer, 2000), ist diese ein weiterer Hinweis auf die Möglichkeit, daß 2BC eventuell bei diesem ATP-abhängigen Schritt der Bildung der COPII-Vesikel das Protein Sar1 ersetzen könnte und damit diese Regulation durch eine zelluläre Proteinkinase umgangen würde.

In der vorliegenden Arbeit wurden Hinweise auf beide beschriebenen Möglichkeiten der Funktion des 2BC bei der Vesikelformation gefunden, indem z. B. flache Bereiche der Kolo-kalisation der Marker 2B und p63 auf den ER-Membranen detektiert wurden, noch bevor an diesen Stellen Poliovirus-Vesikel gebildet wurden. Dies weist darauf hin, daß das Protein 2BC bzw. 2B noch vor der Rekrutierung des COPII-Coat an den Membranen des ER konzentriert wird (Abb. 30 und 31). In dieser Arbeit wurde also erstmals das Signal des 2B-Markers an anderen Membranen als an denen der Poliovirus-Vesikel detektiert (Bienz et al., 1994; Egger et al., 1996; Schlegel et al., 1996).

Die Tatsache, daß die Poliovirus-Vesikel im Cytoplasma der Zelle akkumulieren (Dales et al., 1965; Egger et al., 2000) und nicht wie anterograde Transportvesikel mit nachgelagerten Organellen fusionieren (Klumperman, 2000; Antonny und Schekman, 2001), spricht entweder für die Substitution des Sar1 durch 2BC, oder für eine andere Funktion von 2BC, die die GTPase-Aktivität von Sar1 reduziert und den COPII-Coat somit stabilisiert. Da trotz der intensiven Interaktionen mancher Cargo-Proteine mit dem COPII-Coat bisher noch keine Inhibition der GTPase-Aktivität von Sar1 durch Cargo-Proteine beschrieben wurde (Springer et al., 1999), erscheint die Substitution von Sar1 durch 2BC als elegante Erklärungsmöglichkeit für die Akkumulation der COPII-positiven Poliovirus-Vesikel.

Da während dieser Arbeit kein Antikörper gegen Sar1 zur Verfügung stand, sollte mit dem Inhibitor des COPII-Prozeß der Vesikelbildung überprüft werden, ob Sar1 auf den Poliovirus-Vesikeln vorhanden ist, oder durch 2BC ersetzt wurde. H89 ist ein Proteinkinase-Inhibitor, der mehrere Serin-Threonin-Kinasen bei millimolaren Konzentrationen inhibiert, die Proteinkinase A jedoch schon bei einer Konzentration im nanomolaren Bereich (Muniz et al., 1997). H89 gehört

zur Gruppe der Isochinolin-Sulfonamide und wirkt durch die Interaktionen mit der ATP-Bindungsstelle der Proteinkinasen, wodurch die Bindung von ATP an diese Proteinkinasen verhindert wird (Lee und Linstedt, 2000). Die kompetitive Hemmung von verschiedenen Proteinkinasen durch H89 ist abhängig von dessen Konzentration, so wurde z.B. eine Inhibition der Proteinkinase A bei einer H89-Konzentration erreicht, die 660 mal niedriger war, als die bei der Inhibition von Proteinkinase C benötigte Konzentration von H89 (Chijiwa et al., 1990). Daher wurde H89 in Experimenten hauptsächlich als Inhibitor der Proteinkinase A eingesetzt. Durch die Behandlung von Zellen mit H89 wurde die Inhibition sowohl des ER-Golgi Transports, als auch die Inhibition des exocytotischen Transports von den Membranen des trans Golgi zur Plasmamembran bei millimolaren Konzentrationen von H89 beschrieben (Muniz et al., 1997), Daher ist die Proteinkinase A wahrscheinlich nicht für diesen Prozeß verantwortlich, da diese schon bei nanomolaren Konzentrationen des H89 inhibiert wird, bei diesen Konzentrationen aber noch keine Veränderung des Sec13-Signals zu detektieren war (Lee und Linstedt, 2000). Für die Inhibition des Transports vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran ist die Wirkung von H89 auf die Proteinkinase D verantwortlich (Jamora et al., 1999).

Die Proteinkinase, deren Inhibition für die Blockierung des Transports vom ER zum Golgi-Apparat verantwortlich ist, ist bisher unbekannt (Lee und Linstedt, 2000) Durch die Verwendung anderer spezifischer Inhibitoren konnte jedoch ausgeschlossen werden, daß die Proteinkinasen A und C dabei eine Rolle spielen (Lee und Linstedt, 2000). Daher wurde die Existenz einer neuen, bisher unbekannten Proteinkinase mit der Rolle der Regulation des anterograden Transports vom ER zum Golgi vermutet (Lee und Linstedt, 2000). Durch die Immunmarkierung von anterograden COPII-Transportvesikeln durch Antikörper gegen Sec13 in H89-behandelten Zellen konnte nachgewiesen werden, daß die Rekrutierung von Sec13 an die Membranen der ERES bzw. der COPII-Vesikel durch H89 unterbunden war (Lee und Linstedt, 2000), wobei diese Inhibition zunächst auf einen Schritt zurückgeführt wurde, der unabhängig von der Sar1-Aktivierung zu Beginn der Vesikelbildung war. Daraus wurde geschlossen, daß H89 einen Einfluß auf die Rekrutierung der späteren Bestandteile des COPII-Coat, entweder den Sec23/24-Komplex oder den Sec13/31-Komplex, hat (Lee und Linstedt, 2000). Allerdings wurde auch artifiziell induzierter retrograder Transport vom Golgi zum ER durch die Behandlung der Zellen mit H89 inhibiert, sodaß auch eine Funktion der unbekannten Proteinkinase bei der Regulation des bidirektionalen Transports zwischen ER und Golgi vermutet wurde (Aridor et al., 2001). Die Behandlung von Zellen mit 50 µM H89 für 10 min. führte zum Verschwinden der typischen punktuellen Markierung der ERES und der COPII-Vesikel durch Antikörper gegen Sec13 und zu einer diffusen Markierung des Cytoplasmas und des Zellkerns der behandelten Zellen (Lee und Linstedt, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde der gleiche Effekt bei der Immunfluoreszenz mit Sec13-Markierung erst bei der Konzentration von 100µM H89 und 10 min. Inkubationszeit erreicht. Allerdings hatte

eine längere Inkubation bei dieser Konzentration H89 oder die Verwendung von H89 in höheren Konzentrationen einen deutlich cytotoxischen Effekt auf die behandelten Zellen, sodaß diese abstarben, sich von der Unterlage ablösten und nicht mehr untersucht werden konnten. Von einer anderen Arbeitsgruppe konnte durch die Rekonstitution der COPII-Vesikelbildung unter H89 gezeigt werden, daß nicht - wie zuvor vermutet - ein später Schritt der Bildung des COPII-Coat durch H89 inhibiert wird, sondern bereits die ATP-abhängige Aktivierung von Sar1 (Aridor et al., 2000). Damit wurde ebenfalls das Verschwinden der Markierung der ERES und der COPII-Vesikel durch den Sec13-Antikörper in der vorangegangenen Arbeit erklärt, da ohne die Aktivierung von Sar1 aufgrund der sequenziellen Bindung der Bestandteile des COPII-Coat, weder die Bindung des Sec23/24-Komplex noch die spätere Bindung der Sec13/31-Komplex stattfinden kann. Aus diesem Grund erschien die Verwendung des H89-Inhibitors in dieser Arbeit eine geeignete Methode, um die Präsenz von Sar1 auf den Poliovirus-Vesikeln zu überprüfen.

Die nach der H89-Behandlung in der vorliegenden Arbeit beobachtete, verstärkte Assoziation des 2B-Signals mit den ER-Membranen und die fehlende Kolo-kalisation des eher tubulären 2B-Signals mit den verbliebenen homogenen punktuellen Signalen des Sec13-Markers ließen auf die Präsenz des Sar1 in den Poliovirus-Vesikeln schließen. Im Gegensatz zu den publizierten Effekten der H89-Behandlung auf die Markierung durch den Sec13-Antikörper (Lee und Linstedt, 2000), wurde in der vorliegenden Arbeit nach der H89-Inkubation in der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie, ein stärkeres, homogen über die Zelle verteiltes Signal des Sec13-Markers gefunden, das ebenfalls stark im Nukleus der Zellen angereichert war (Abb. 44). Da jedoch in der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie keine vesikulären Strukturen nach der H89-Inkubation mehr mit dem Sec13-Antikörper detektiert wurden, spricht dies für die Inhibition der Bildung der COPII-Vesikel durch H89 auch in den BT7-H Zellen der vorliegenden Arbeit. Nach der Dekonvolution von Bildserien H89-behandelter Zellen, wurde in den MIPs ein punktförmiges Signal des Sec13-Markers detektiert, das homogen über das gesamte Cytoplasma der Zellen verteilt war (Abb. 45). Der Durchmesser dieser Sec13-positiven Strukturen war ca. 2 bis 3 mal kleiner als der der COPII-Vesikel vor der Behandlung mit H89. Die geringe Größe der Sec13-positiven Strukturen nach der H89-Behandlung und deren homogene Verteilung in der Zelle ließen darauf schließen, daß es sich dabei um unregelmäßig verteilte Hintergrundfluoreszenz im Cytoplasma handelt, deren Unterschiede und Übergänge durch die Dekonvolution verstärkt werden. Dafür spricht auch die geringe Intensität des Sec13-Signals nach der H89-Behandlung in den Aufnahmen vor der Dekonvolution, die bei den gleichen Einstellungen des Mikroskops nur ca. ein Drittel der Intensitäten des Sec13-Signals der Zellen vor der H89-Behandlung betrug. Die zweite Möglichkeit, diese Ergebnisse zu interpretieren ist, daß - vorausgesetzt, das Protein 2BC könnte Sar1 bei der Vesikelbildung ersetzen - auch 2BC von der, durch H89 inhibierten, Proteinkinase aktiviert wird. Dies würde eine genaue strukturelle Übereinstimmung der ATP-Bindungsstellen beider Proteine

bzw. eine funktionelle Übereinstimmung dieser Proteine voraussetzen. H89 wirkt durch die kompetitive, irreversible Interaktion mit der ATP-Bindungsstelle der inhibierten Proteinkinase (Aridor et al., 2001). Es ist möglich, daß diese Bindungsstellen bei der unbekannt Proteinkinase, die die Aktivierung von Sar1 reguliert, und beim Poliovirus-Protein 2BC ähnlich sind. Das würde bedeuten, daß 2BC durch H89 ebenfalls spezifisch inhibiert würde. Allerdings gibt es darüber derzeit noch keine weiteren Kenntnisse.

Durch die Cytotoxizität des H89 bei der Inkubation mit einer Konzentration von 100 µM für mehr als 10 min führten die Versuche, einen Rückhalt des PV-Protein 2BC im ER unter H89-Behandlung mit Hilfe der Immun-Elektronenmikroskopie nachzuweisen, zu keinem verwertbaren Ergebnis. Durch die längere Zeit bis zur Fixierung der Zellen durch die Trypsinisierung und Zentrifugation der Zellen bei beiden verwendeten Arten der Einbettung für die Elektronenmikroskopie kam es zum Absterben der behandelten Zellen vor der Fixierung, sodaß in den Epon-Einbettungen überwiegend tote Zellen gefunden wurden, die ausschließlich dilatiertes ER in Form von großen, vesikulären Strukturen im Cytoplasma aufwiesen und keine Zellmembranen mehr besaßen (Abb. 46). In den LR-Gold- Einbettungen zum Immunnachweis der 2BC-Proteine konnte aufgrund der schlechteren Strukturhaltung dieser Einbettungsmethode zwischen den Dilatationen des ER und den Clustern der Poliovirus-Vesikel nicht mehr unterschieden werden und daher keine Aussage über die eventuelle Lokalisierung des 2B-Signals in den Membranen des ER gemacht werden. Diese Wirkung von H89 auf die Zellen wurde bisher noch nicht beschrieben (Lee und Linstedt, 2000; Aridor et al., 2001).

Die beschriebenen Beobachtungen führen zur Vermutung, daß Sar1 wahrscheinlich auf den Membranen der Poliovirus-Vesikel vorhanden ist, und diese somit durch einen vollständigen COPII-Coat gebildet werden. Die Versuche mit dem Kinase-Inhibitor H89 in der Immunfluoreszenz deuten darauf hin, daß - besonders zu den späteren Zeitpunkten der Infektion - das Poliovirus-Protein 2B in den Membranen des ER zurückgehalten wird, da die Bildung der Poliovirus-Vesikel durch die Funktion von H89 wahrscheinlich inhibiert wird. Der funktionelle Ausschluß der ER-Membranproteine bei der Bildung der Poliovirus-Vesikel, die keinen Unterschied zur Bildung der anterograden Transportvesikel erkennen ließ, unterstützt diese Hypothese, da Sar1 bei der Selektion der Cargo-Proteine eine Schlüsselrolle einnimmt (Aridor et al., 1998; 1999; 2001). Allerdings kann der endgültige Beweis für diese Hypothese nur mit einem Antikörper gegen Sar1 geführt werden, mit dem eine Kolo-kalisation von Sar1 und 2BC auf den Poliovirus-Vesikeln nachgewiesen werden könnte.

Die Rolle des Sar1 bei der Sortierung und Selektion der Cargo-Proteine während der Bildung der COPII-Vesikel an den Membranen des ER wurde bereits diskutiert (siehe oben). Sar1 ermöglicht durch Interaktionen mit den Cargo-Proteinen bzw. Cargo-Rezeptoren noch vor der Rekrutierung

des Sec23- und des Sec13-Komplex, daß die Cargo-Proteine für den Transport in die anterograden Transportvesikel aufgenommen werden (Aridor et al., 2001). Da die getesteten ER-Membranmarker weder in die anterograden Transportvesikel noch in die Poliovirus-Vesikel aufgenommen wurden, deutet darauf hin, daß die Mechanismen der Selektion der Proteine bei der Bildung der COPII-Vesikel auch in der Poliovirus-Infektion funktionell sind. Bisher ist nicht bekannt, ob Sar1 ebenfalls bei der Selektion der in dieser Arbeit nachgewiesenen ER-Proteine eine Rolle spielt. Es ist aber anzunehmen, daß Sar1 bei der Bildung der Poliovirus-Vesikel vorhanden ist und an der Selektion der Cargo-Proteine beteiligt ist, da der Ausschluß der getesteten Proteine bereits früh bei der Bildung der Poliovirus-Vesikel - wie auch bei der Bildung der anterograden Transportvesikel - stattfindet. Dies steht im Gegensatz zu den zuvor in dieser Arbeit dargestellten Hinweisen bezüglich der Vergleichbarkeit der Eigenschaften des 2BC-Proteins und des Sar1.

Die funktionelle Selektion der ER-Membranproteine bei der Bildung der Poliovirus-Vesikel wird deutlich, da eine große Anzahl Poliovirus-Vesikel in den infizierten Zellen detektiert wurden, die noch mit den Membranen des ER verbunden waren. Trotzdem konnte nur an den Kontaktstellen dieser Vesikel eine Kolo-kalisation des viralen Vesikelmarkers mit den ER-Membranproteinen nachgewiesen werden. Zu diesem Zeitpunkt, also bei der Bindung des Sec13-Komplexes an die Membranen, war es also bereits einem Ausschluß der ER-Proteine von den Membranen der Vesikel gekommen. Dies bestätigten die Experimente der vorliegenden Arbeit, in denen die anterograden Transportvesikel an den Membranen des ER durch die Markierung des Sec13 oder Sec31 dargestellt wurden. Dabei war ebenfalls zum Zeitpunkt der Markierung mit diesen späten COPII-Bestandteilen die ER-Membranproteine bereits von den Vesikeln ausgeschlossen.

Welcher genaue Mechanismus der Rekrutierung des COPII-Coat durch 2BC zugrunde liegt, ist bisher noch nicht bekannt und stellt ein interessantes Gebiet für weitere Untersuchungen dar. Durch die beschriebenen Ergebnisse könnte 2BC als Cargo-Protein wirken, daß durch die Interaktion mit den COPII-Proteinen die Bildung von Poliovirus-Vesikeln modelliert, wie dies bereits für andere Cargo-Proteine beschrieben wurde (Aridor et al., 1998; 1999; 2001). Zwei Beobachtungen der vorliegenden Arbeit sind in diesem Zusammenhang essentiell. Erstens tragen schon früh nach der Infektion mit Poliovirus alle zellulären COPII-positiven Strukturen auch das virale Protein 2B. Zweitens wird durch die Kolo-kalisation des 2BC-Proteins mit den ER-Markern auf flachen Bereichen der ER-Membranen, an denen noch keine PV-Vesikel gebildet wurden, deutlich, daß das 2BC-Protein vor der Rekrutierung des COPII-Coats an den Membranen des ER konzentriert wird. Beide Beobachtungen sprechen dafür, daß die COPII-Proteine eine hohe Affinität zu 2BC haben. Diese hohe Affinität zu 2BC sorgt wahrscheinlich dafür, daß COPII-Vesikel nach der Infektion nur noch an den Stellen der ER-Membranen gebildet werden,

an denen bereits 2BC konzentriert wurde. Da bisher die molekularen Mechanismen der Regulation der Bildung von anterograden Transportvesikeln durch die Interaktionen von Cargo-Proteinen mit den COPII-Proteinen nicht bekannt sind, stellt das PV-Protein 2BC einen geeigneten Kandidaten für solche Untersuchungen dar. Das Protein 2BC könnte dabei als nicht-zelluläres Protein, das offenbar eine hohe Affinität zu den COPII-Proteinen besitzt, gezielt zur Manipulation dieser Prozesse eingesetzt werden.

4.6. Mögliche Ursachen für die Akkumulation der Poliovirus-Vesikel

Durch beide im vorherigen Kapitel genannten Möglichkeiten für die Interaktion von 2BC mit dem COPII-Coat könnte auch das Phänomen der Akkumulation der Vesikel während der Poliovirus-Infektion erklärt werden. Die Beobachtungen dieser Arbeit, daß alle COPII-Vesikel der Zellen schon früh nach der Infektion auch 2B-Proteine tragen und das eine große Anzahl COPII-positiver PV-Vesikel in der Zelle zu detektieren war bzw. diese Vesikel schon früh in der Infektion akkumulierten, sprechen für eine Stabilisierung des COPII-Coat auf den PV-Vesikeln. In uninfizierten Zellen besitzt der COPII-Coat eine intrinsische Instabilität, da durch die Bindung der letzten COPII-Untereinheit, dem Sec13-Komplex, die GTPase-Aktivität des aktivierten Sar1 um ein Vielfaches gesteigert wird (Antonny et al., 2001). Durch die folgende Spaltung des GTP kommt es zur schnellen Dissoziation des COPII-Coats von den Vesikeln schon bald nach deren Bildung. Die Dissoziation ist mit 10 sec zwar langsamer als die Bildung des COPII-Coats (unter 2 sec), stellt jedoch ebenfalls einen schnellen Prozeß dar, wodurch die Anzahl der anterograden Transportvesikel mit COPII-Coat in der Zelle stets niedrig ist (Antonny et al., 2001). Diese schnelle Dissoziation des COPII-Coats ermöglicht die baldige Fusion der anterograden Vesikel mit den oder zu den VTCs oder dem ERGIC durch die Funktion der SNAREs, die wahrscheinlich schon bald nach der Bildung der COPII-Vesikel stattfindet (Hong, 1998; Klumperman, 2000; Antonny et al., 2001). Die große Anzahl der COPII-positiven Poliovirus-Vesikel schon früh in der Infektion ist ein Anzeichen dafür, daß die Halbwertszeit des COPII-Coat auf diesen Vesikeln wahrscheinlich länger ist, als auf den Vesikeln des anterograden Transports in uninfizierten Zellen.

Eine Funktion des 2BC als Priming-Protein bei der Vesikelbildung könnte die Stabilität des COPII-Coats durch eine Interaktion mit Sar1 oder mit dem Sec23-Komplex erhöhen. Bisher konnte jedoch eine solche Funktion eines Cargo-Proteins noch nicht beschrieben werden (Springer et al., 1999). Die kurze Lebensdauer, also der hohe „Turn over“ der anterograden Transportvesikel in den uninfizierten Zellen spricht dafür, daß die Funktion des PV-Proteins 2BC auf einem anderen Prinzip beruht, als das der zellulären Cargo- oder Priming-Proteine. Bei der Verwendung von in vitro-Rekonstitutionssystemen konnte jedoch der COPII-Coat stabilisiert werden, indem dem Reaktionsmix statt GTP die nicht hydrolysierbaren GTP-Analoga GTP- γ S oder GMP-PNP zugegeben wurden (Matsuoka et al., 1998). Weiter konnte der COPII-Coat in Zellen stabilisiert werden, die eine GTPase-defiziente Mutante von

Sar1 exprimierten, die GTP binden aber nicht spalten kann (Nakano et al., 1994; Yamanushi et al., 1996). Die Stabilisierung des COPII-Coat führte in allen Fällen zur Anreicherung der COPII-Vesikel. Die einzige bisher bekannte Veränderung, die zur Akkumulation der anterograden COPII-Vesikel führte, ist also die Blockierung der GTPase-Funktion des Sar1. Die eleganteste Erklärungsmöglichkeit für die Akkumulation der PV-Vesikel wäre daher die Substitution des Sar1 durch das PV-Protein 2BC. Für 2BC wurde zwar eine ATPase-Aktivität gezeigt, jedoch besitzt dieses Protein ebenfalls eine Affinität zu GTP, das mit dem ATP um die Bindungsstellen an den sogenannten A und B Motiven des 2C-Teils konkurriert (Rodriguez und Carrasco, 1993; Pfister und Wimmer, 1999). Im Gegensatz zur Bindung des ATP konnte jedoch bei der Bindung von GTP an 2C keine Hydrolyse des Substrates detektiert werden (Pfister und Wimmer, 1999). Aus diesem Grund wäre es möglich, daß das 2BC-Protein mit Sar1 um die Bindung des GTP konkurriert, aber im Gegensatz zu Sar1 dieses nicht spaltet. Falls das 2BC die restlichen Komponenten des COPII-Coat an die Membranen des ER rekrutieren könnte und so die Bildung der Vesikel induziert, wäre diese Substitution eine Erklärung für die Stabilisierung des COPII-Coat und damit für die Akkumulation der Poliovirus-Vesikel im Cytoplasma der infizierten und 2BC-transfizierten Zellen.

Wie bereits beschrieben, sprechen auch einige Hinweise gegen die Substitution des Sar1 durch PV-2BC, wie z.B. der intakte Selektionsprozeß von ER-Proteinen und die Anreicherung der 2B-Proteine im ER nach der Inhibition mit H89. Aus diesen Gründen kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob Sar1 tatsächlich auf den Membranen der Poliovirus-Vesikel vorhanden ist. Die einzige, derzeit plausible Erklärung für die Akkumulation der Poliovirus-Vesikel im Cytoplasma während der Infektion ist, daß der COPII-Coat nicht von den Membranen der PV-Vesikel abdissoziieren kann. Vermutlich kommt es nach der Bildung der Poliovirus-Vesikel - im Gegensatz zu den anterograden Transportvesikeln - nicht zur für die Dissoziation des COPII-Coat benötigten Spaltung des GTP. Ob die fehlende Spaltung des GTP dadurch zustande kommt, daß das Sar1 dabei durch 2BC ersetzt wird, das gebundenes GTP nicht spaltet, oder durch die Interaktionen von 2BC mit Sar1 die Hydrolyse des GTP durch Sar1 blockiert wird, ist derzeit nicht zu beantworten und wird nur durch weiterführende Versuche aufzuklären sein.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die Akkumulation der Poliovirus-Vesikel in der Infektion, die jedoch im Verlauf der Arbeit widerlegt wurde, war die beobachtete Depolymerisierung der Aktinfilamente. Die Aktinfilamente spielen neben den Mikrotubuli eine zentrale Rolle bei der strukturellen Organisation der Zelle und beim intrazellulären Transport (Clague, 1998). Dabei übernehmen die Aktinfilamente besonders die Funktion des Kurzstreckentransports auch von zellulären Transportcontainern, die jedoch für den Transport über längere Strecken an die Mikrotubuli gebunden werden (Wacker et al., 1997; Clague, 1998). Aus diesen Ergebnissen entstand die Vermutung, daß durch die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Depolymerisation des Aktincytoskeletts die Poliovirus-Vesikel aufgrund des fehlenden zellulären Kurzstreckentransports akkumulieren könnten.

Diese Hypothese wurde jedoch dadurch widerlegt, daß die PV-Vesikel schon zu den frühen Zeiten der Infektion akkumulierten bzw. Cluster bildeten. Zu diesen frühen Zeiten der Infektion konnte noch keine Veränderung bzw. Depolymerisation des Aktincytoskeletts beobachtet werden. Im Gegensatz zu früheren Arbeiten (Lenk und Penman, 1979) konnte keine Veränderung der Struktur der Mikrotubuli in Poliovirus-infizierten Zellen beobachtet werden, bevor diese die Anzeichen des CPE zeigten. Jedoch wiesen Lenk und Penman (1979) bereits auf einen frühen Effekt der Reorganisation von Teilen des Cytoskeletts hin. Diese Autoren konnten entsprechende Veränderungen des Cytoskeletts in der frühen Infektion detektieren, die auch bei der Inkubation mit Guanidin-Hydrochlorid entstanden, das die virale Replikation inhibiert. Durch Guanidin-Hydrochlorid bleibt die Menge der viralen Proteine in der Wirtszelle gering, da durch die Inhibition der viralen RNA-Replikation nur wenige virale RNA-Moleküle für die Translation zur Verfügung stehen. Aus diesen Ergebnissen schlossen die Autoren, daß es sich bei den beobachteten Veränderungen des Cytoskeletts um einen primären Effekt der Poliovirus-Infektion handeln muß (Lenk und Penman, 1979).

Weitere Experimente bezüglich der Rolle des Cytoskeletts in der Poliovirus-Infektion zeigten, daß ein funktionelles Cytoskelett nicht für den Verlauf der Infektion des Poliovirus essentiell ist (Doedens et al., 1994), jedoch wurde von den Autoren dieser Studie lediglich der Effekt von zwei Substanzen auf die Poliovirus-Infektion getestet. Das verwendete Nocodazol depolymerisiert die Mikrotubuli und in deren Folge auch das Vimentin-Gerüst der Zelle, während Cytochalasin D die Mikrofilamente bzw. die Keratin-Fasern zerstört (Klymkowsky et al., 1989). Doedens et al. (1994) betrachteten sowohl die Verteilung der PV-Proteine nach Applikation der Substanzen, als auch die Produktion neuer Viren in der behandelten Zellkultur. Während die PV-Proteine eine von der unbehandelten, infizierten Zelle abweichende Verteilung zeigten, wurde durch diese Inhibitoren die Replikation des Virus nicht beeinflusst (Doedens et al., 1994). Da der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Effekt auf die Aktinfilamente durch die Infektion mit Poliovirus hervorgerufen wurde und Doedens et al. (1994) keine Untersuchungen an Aktinfilamenten durchführten, stehen deren Ergebnisse nicht im Gegensatz zu den hier gemachten Untersuchungen. Ein weiterer Hinweis auf die Veränderung von Teilen des Cytoskeletts während der Poliovirus-Infektion waren Untersuchungen, die eine strukturelle Veränderung eines Proteins des Cytoskeletts (MAP4) im Verlauf der Infektion demonstrierten (Joachims und Etchison, 1992; Joachims et al., 1995). Dieses Protein ist mit den Mikrotubuli assoziiert und hat eine katalytische Aktivität beim Prozeß der Polymerisierung des Tubulin zu Mikrotubuli. Die Größe des MAP4 wurde durch die PV-Infektion deutlich reduziert, was jedoch nicht auf die Reaktion einer Protease zurückzuführen war (Joachims und Etchison, 1992). Weitere Untersuchungen dieses Phänomens wurden nicht publiziert. Die beobachteten Veränderungen des Cytoskeletts infizierter Zellen stellen also wahrscheinlich einen sekundären Effekt der PV-Infektion dar, die die keine Funktion beim Aufbau des viralen Replikationskomplex hat. Insbesondere scheint dieses Phänomen nicht für die Akkumulation der Poliovirus-Vesikel in den frühen Phasen der Infektion verantwortlich zu sein.

4.7. Einfluß der Poliovirus-Infektion auf den zellulären Transport

Aufgrund der Akkumulation der Poliovirus-Vesikel im Cytoplasma wurde vermutet, daß der normale Ablauf des anterograden Transports in der infizierten Zelle nicht mehr aufrecht erhalten wird. Es gab bereits früher Hinweise darauf, daß die Infektion mit Poliovirus die sekretorische Tätigkeit der Zellen inhibiert, wie verschiedene Versuchsansätze zeigen konnten. So wurde gezeigt, daß die Präsentation von Antigenen durch die Inhibition des Transports des MHC I-Moleküls („major histocompatibility complex I“) zur Plasmamembran in Poliovirus-infizierten Zellen unterbunden ist (Deitz et al., 2000). Diese Autoren beschreiben weiterhin, daß das PV-Protein 3A wenn es alleine in Zellen exprimiert wird, den gleichen Effekt der Blockierung der Antigen-Präsentation wie die PV-Infektion auslöst. Allerdings wurde diese Funktion des PV-Proteins 3A bei keinem anderen Vertreter der Picornaviren gefunden (Deitz et al., 2000), dessen Sequenz ansonsten bei den Picornaviren konserviert ist (Kuhn et al., 1988; Doedens et al., 1997).

Weitere Arbeiten bestätigten, daß sowohl durch die Infektion mit Poliovirus, als auch durch die Expression des Proteins 3A der zelluläre Transport vom ER zum Golgi-Apparat blockiert ist (Doedens et al., 1997). Bei den ausschließlich 3A-exprimierenden Zellen wurden Veränderungen der ER-Membranen beobachtet, die als Grund für die Inhibition des anterograden Transports vermutet wurde (Doedens et al., 1997). In einer anderen Studie wurden im Elektronenmikroskop charakteristische Membranveränderungen nach der Expression des Proteins 3AB sowie weiterer membranbindender Proteine gefunden (Egger et al., 2000). Die Membranveränderungen nach der Expression von 3AB erschienen als spiralförmig aufgewickelten Strukturen, die aus mehreren dicht miteinander assoziierten Membranschichten aufgebaut waren. Wie von diesen Autoren gezeigt wurde, konnten diese Membranen nicht für die Bildung von Poliovirus-Vesikeln und nicht zum Aufbau eines funktionellen Replikationskomplex verwendet werden (Egger et al., 2001). Nach der Expression von 3AB waren die Zellen weniger empfänglich für eine Superinfektion mit Poliovirus, da die Menge der für den Aufbau der viralen Replikationskomplexe zur Verfügung stehenden ER-Membranen reduziert worden war. Aus diesen Gründen wäre es möglich, daß die durch die Membranveränderungen in der Expression von 3A beobachtete Inhibition der Sekretion zellulärer Proteine ebenfalls dadurch zustande kommt, daß die Menge der Membranen, die für die Bildung der anterograden Transportvesikel zur Verfügung stehen, durch die Expression von 3A bzw. 3AB reduziert werden.

Von anderen Autoren konnte eine Reihe von Veränderungen der Membranen des ER in Zellen beobachtet werden, in denen z.B. Chaperon-Funktionen im ER blockiert wurden oder Proteine mit Faltungsdefekten exprimiert wurden (Ellgaard und Helenius, 2001). Diese Effekte führten zur Anreicherung von sekretorischen Proteinen an den Membranen des ER, wahrscheinlich in den Bereichen der ERES. In diesen Bereichen der veränderten ER-Membranen ist die Bildung anterograder Transportvesikel offenbar nicht mehr möglich, der Mechanismus dieser Inhibition ist bisher jedoch nicht geklärt (Zhang et al., 1997).

Deitz et al. (2000) bestätigten in ihrer Arbeit, daß die Inhibition der Sekretion nicht essentiell für die Bildung der Poliovirus-Vesikel ist. Das Protein 3AB bzw. der P3-Precursor sind in der Poliovirus-Infektion an den Membranen der gebildeten PV-Vesikel, also im Replikationskomplex lokalisiert. Es konnte von Towner et al. (1998) gezeigt werden, daß die durch eine Mutation zerstörte Funktion des Proteins 3AB bei der viralen Replikation nur durch den Precursor P3 in trans komplementierbar war, nicht jedoch durch funktionelles 3AB Protein. Aufgrund dieser Ergebnisse vermuten die selben Autoren, daß der P3-Precursor eventuell andere Funktionen bei der Replikation der viralen RNA ausüben könnte, als das Protein 3AB, da der P3-Precursor als Ganzes mit den Membranen des Replikationskomplex interagieren kann. Diese unterschiedlichen Funktionen könnten darin bestehen, daß der P3-Precursor eine Funktion bei der Minus-Strang-Synthese und das Protein 3AB eine Funktion bei der Plus-Strang-Synthese der viralen RNA haben könnten (Towner et al., 1998). Die Funktion von 3AB könnte darin bestehen, daß durch dieses Protein das zur Initiation der RNA-Synthese benötigte VPg zur Verfügung gestellt wird (Towner et al., 1998).

Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie PV-infizierter Zellen der vorliegenden Arbeit zeigten, daß die beobachtete Texturänderung des ER vor der Desintegration des Golgi-Apparates stattfand. Dies kann als weiterer Hinweis auf den Mechanismus der Vesikelbildung durch den COPII-Coat gewertet werden. Da schon zu den frühen Zeitpunkten der Infektion in den Zellen keine COPII-Vesikel mehr detektiert werden konnten, die kein 2B-Protein enthielten, ist davon auszugehen, daß der anterograde Transport durch die Akkumulation der PV-Vesikel blockiert war (Doedens et al., 1997; Deitz et al., 2000). Durch die fortlaufende Bildung der PV-Vesikel könnte es zunächst zur Veränderung der Verteilung der ER-Membranen bzw. der getesteten ER-Membranmarker kommen, die die beobachtete Texturänderung des ER zur Folge hat. In den späteren Phasen der Infektion kommt es dadurch zum beobachteten Verschwinden der ER-Membranen Poliovirus-infizierter Zellen. Durch den fehlenden anterograden Transport werden den nachgelagerten Organellen (insbesondere dem Golgi-Apparat) weder neue Proteine noch Membranmaterial nachgeliefert. In Zellen die zur gleichen Zeit nach der Infektion fixiert wurden, wie die, in denen die Texturänderung des ER auftrat, war der Golgi-Apparat noch nicht verändert. Die beschriebene Desintegration des Golgi-Apparates (Bienz et al., 1973; Sandoval und Carrasco, 1997), stellt also offenbar ein sekundäres Phänomen der Poliovirus-Infektion dar. Die Markierungen der Golgi-Membranen und die seltene Kolo-kalisation von 2B mit den Golgi-Markern zeigten, daß wahrscheinlich der Golgi-Apparat nicht der primäre Donor der Poliovirus-Vesikel ist (Abb. 33). Diese Ergebnisse bestätigten die zuvor gefundenen Ergebnisse von Bolten et al. (1998), die zwar eine Umverteilung der Strukturen des Golgi-Apparates zeigten, aber keine Kolo-kalisation des Golgi-Markers p58K mit dem Marker der Poliovirus-Vesikel. Diese Umstrukturierung des Golgi-Apparates deutet darauf hin, daß der Golgi-Apparat aufgrund des fehlenden anterograden Transports in den Poliovirus-infizierten Zellen

desintegriert. Diese Desintegration des Golgi-Apparates könnte durch die beobachtete Depolymerisierung der Aktinfilamente verstärkt werden, da das Aktin- und Tubulin-Cytoskelett das strukturelle Gerüst des Golgi-Apparates bilden (Katsumoto et al., 1991).

Wirkung von Brefeldin A auf die Bildung der Poliovirus-Vesikel und die virale RNA-Replikation

Brefeldin A ist ein Metabolit des Pilzes *Penicillium brefeldianum* und wurde zuerst von Haerri et al. (1963) isoliert. Brefeldin A (= BFA) wurde hauptsächlich zur Untersuchung des intrazellulären Transports und der Funktion des Golgi-Apparates eingesetzt (Chardin und McCormick, 1999), da schon frühzeitig die dramatischen Effekte von BFA auf die Struktur des Golgi-Apparates erkannt wurden. Die Untersuchung von Zellen in der Immunfluoreszenz nach der Markierung von Golgi-Proteinen zeigte, daß schon wenigen Minuten nach der Behandlung mit BFA der Golgi-Apparat seine Struktur verliert und die Golgi-Proteine zunächst in tubulären Strukturen im Cytoplasma und später an den Membranen des ER zu finden sind (Martinez et al., 1997). Die Effekte des BFA waren nach dessen Entfernung jedoch komplett reversibel (Zuber et al., 1991). Besonders die deutliche Kolokalisation von Golgi-Markern und ER-Markern im ER-Netzwerk führte zu der Annahme, daß der zelluläre Transport zwischen dem ER und dem Golgi durch BFA gestört würde und so die Sortierung der Proteine nicht mehr aufrecht erhalten werden konnte. Zunächst aber konnte der molekulare Mechanismus der Wirkung von BFA nicht geklärt werden. Seitdem in den ersten Studien mit Poliovirus-infizierten Zellen gezeigt werden konnte, daß BFA eine inhibitorische Wirkung auf die Replikation des Poliovirus hat, wurde es auch für die Untersuchung der Bildung der Poliovirus-Vesikel verwendet (Irurzun et al., 1992; Maynell et al., 1992; Tucker et al., 1993). Mit verschiedenen experimentellen Ansätzen konnte gezeigt werden, daß BFA die RNA-Replikation des Poliovirus inhibiert, nicht aber die Translation, Morphogenese und Aufnahme des Virus in die Zelle (Irurzun et al., 1992; Maynell et al., 1992; Tucker et al., 1993). Dieser Effekt war eindeutig einer Funktion der Wirtszelle zuzuordnen, da in BFA-resistenten Zellen nach der Zugabe von BFA Poliovirus RNA-Replikation stattfand und bisher keine BFA-resistenten Poliovirus-Mutanten isoliert werden konnten (Doedens et al., 1994).

Inzwischen konnte eine der Funktionen von BFA in Mammalia-Zellen auf molekularer Ebene charakterisiert werden. BFA blockiert das Protein Sec7, bzw. Proteine mit einer zu Sec7 homologen Sequenz (Peyroche et al., 1999), die die Funktion eines GEFs (eines Guanin Nukleotid-Austauschfaktors) für die GTPase ARF1 haben. Durch die Funktion von BFA wird das am ARF1 gebundene GDP nicht mehr durch ein GTP ersetzt, wodurch dies inaktiv bleibt und wie eine dominant-negative Mutante von ARF1 wirkt (Chardin und McCormick, 1999). ARF1 ist essentiell für die Rekrutierung des COPI-Coat an den Membranen des Golgi-Apparates, der die Bildung der retrograden Transportvesikel durchführt (Klumperman, 2000). Entsprechend ist eine der ersten

Veränderungen, die durch die BFA-Behandlung von Zellen auftritt, die Dissoziation von β -COP, einem Bestandteil des COPI-Coat, von den Membranen des Golgi-Apparates (Donaldson und Klausner, 1994). Durch die Funktion von BFA wird also primär der zelluläre retrograde Transport vom Golgi zum ER blockiert. Allerdings kann diese Funktion nicht die einzige des BFA sein, denn es gibt einige Zelllinien, die natürlicherweise resistent gegen BFA sind, aber dennoch einen funktionellen retrograden Transport aufweisen, wogegen in diesen die Integrität der Lysosomen durch BFA gestört wird (Hunziker et al., 1991). In den Wildtypstämmen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* hat BFA keinen Effekt und selbst in BFA-sensitiven Hefe-Mutanten konnten keine BFA-Effekte beobachtet werden, die auf die Relokalisierung von Golgi-Proteinen in das ER zurückzuführen waren (Dinter und Berger, 1998). Vor allem die Tatsache, daß durch die Inhibition des retrograden Transports durch BFA der Golgi-Apparat desintegriert und Golgi-Proteine in das ER transportiert werden, war nur schwer mit den bestehenden Modellen des sekretorischen Transports zu erklären. Daher wurden zwei unterschiedliche Transportwege des retrograden Transports postuliert (Dinter und Berger, 1998), die später tatsächlich bewiesen werden konnten. Girod et al. (1999) konnten zeigen, daß trotz der Inhibition der Bildung von COPI-Vesikeln durch Mikroinjektion von Antikörpern gegen COPI-Bestandteile oder durch die Inhibition der GTPase-Funktion von COPI durch Expression einer Mutante, das Shiga-Toxin und weitere Enzyme vom Golgi zum ER transportiert werden konnten. Damit wurde ein neuer, COPI-unabhängiger Mechanismus für den Transport vom Golgi zum ER gefunden. Wahrscheinlich werden die Membranen und Proteine des Golgi-Apparates nach der BFA-Behandlung durch diesen COPI-unabhängigen (und damit BFA-unabhängigen) Transportweg zum ER transportiert. Das die Proteine des Golgi-Apparats nach der Behandlung mit BFA im Membransystem des ER gefunden werden bedeutet, daß diese durch nicht mehr aus dem ER abtransportiert werden können, also wahrscheinlich der anterograde Transport, der normalerweise die Integrität des Golgi-Apparates sicherstellt, ebenfalls durch BFA inhibiert wird. In Übereinstimmung mit dieser Annahme, konnte von verschiedenen Autoren gezeigt werden, daß der COPI-Coat auch beim anterograden Transport, und zwar bei der Bildung von Transportcontainern am ERGIC, verwendet wird (Rothman und Wieland, 1996; Schekman und Orci, 1996; Lipincott-Schwartz et al., 2000). Durch die sequentielle Bindung beider COP-Komplexe im anterograden Transport ist die Wirkung des Brefeldin A auf die uninfizierten Zellen erklärbar, da BFA offenbar den zweiten, COPI-abhängigen Schritt des anterograden Transports inhibiert. Dadurch sind aber noch nicht alle Funktionen des BFA erklärt, sondern nur die dominierende Funktion der Inhibition des ARF1.

Da in der vorliegenden Arbeit demonstriert wurde, daß die Poliovirus-Vesikel durch die Funktion des zellulären COPII-Coats gebildet werden, dieser aber nach den derzeitigen Erkenntnissen nicht durch BFA inhibiert wird, ist es schwierig die Inhibition der Poliovirus-Replikation durch BFA zu erklären. Allerdings deuten einige Ergebnisse darauf hin, daß die

Inhibition der RNA-Replikation des Poliovirus durch BFA ein sekundärer Effekt sein könnte. Der intrazelluläre Transport stellt einen vernetzten Prozeß dar, in dem der anterograde und retrograde Transport stark voneinander abhängig sind (Schekman und Melman, 1997). Daher konnte gezeigt werden, daß eine Inhibition des retrograden Transports immer auch sekundär den anterograden Transport blockiert (Gaynor und Emr, 1997). Darauf daß der anterograde Transport sekundär ebenfalls durch BFA inhibiert wird, weisen einige Ergebnisse hin. Erstens wurden - wie beschrieben - nach der BFA-Behandlung verschiedene Golgi-Proteine im ER gefunden, die nicht wieder in andere Kompartimente des anterograden Transport abtransportiert wurden, obwohl sie normalerweise dem anterograden Transportweg folgen (Dinter und Berger, 1998). Zweitens desintegriert das ER im Gegensatz zum Golgi-Apparat nicht durch die H89-Behandlung (Dinter und Berger, 1998; Chardin und McCormick, 1999). Und drittens wurde bisher keine Anreicherung von Proteinen des anterograden Transports in den VTCs oder dem ERGIC in BFA-behandelten Zellen nachgewiesen (Dinter und Berger, 1998).

In den Versuchen zur Inhibition der Poliovirus-Replikation wurde das Brefeldin A schon zu Beginn der Infektion zu den Zellen gegeben (Maynell et al., 1992), die ersten Poliovirus-Vesikel wurde in unbehandelten Zellen jedoch frühestens 2 h nach der Infektion gebildet. Bei dieser Versuchsanordnung ist nach 2 h Inkubation mit BFA zum Zeitpunkt der Bildung der ersten Vesikel wahrscheinlich schon der gesamte sekretorische Transportweg der behandelten Zellen blockiert. Entsprechend würden ebenfalls keine COPII-Vesikel gebildet werden und dies könnte der Grund dafür sein, daß vom Beginn der Infektion an unter BFA 10^5 bis 10^6 Mal weniger Viren gebildet werden, als in einer nicht mit BFA behandelten Kontrolle (Maynell et al., 1992). Diese Ergebnisse werden durch die Tatsache bestätigt, daß frühestens zwei Stunden nach dem Entfernen des BFA, die erneute Synthese von Virionen in den infizierten Zellen beginnt (Maynell et al., 1992). Die gegenseitige Abhängigkeit der Prozesse des anterograden und retrograden Transports wird durch die Bildung der Poliovirus-Vesikel durch den COPII-Mechanismus an den Membranen des ER bestätigt, die zur Depletion des Golgi-Apparates führt, obwohl die Membranen des Golgi-Apparats nicht in diesen Prozeß involviert sind.

Interessanterweise wurde auch in einem Zellfreien System, in dem ein Extrakt aus HeLa-Zellen als Substrat für die Replikation des Poliovirus verwendet wurde, eine Inhibition der viralen RNA-Replikation nachgewiesen (Cuconati et al., 1998). Da in diesem System zelluläre Membranen vorhanden sind (D. Egger und K. Bienz, persönliche Mitteilungen), werden diese Membranen offenbar für den Aufbau eines funktionellen Poliovirus-Replikationskomplex verwendet. Die Tatsache, daß BFA in diesem zellfreien System die Poliovirus-Replikation nur bei sehr hohen Konzentrationen von 80 µg/ml - im Gegensatz zu 2 µg/ml *in vivo* - inhibiert, deutet darauf hin, daß diese beobachtete Inhibition eventuell durch eine weitere Funktion des BFA hervorgerufen wird (Cuconati et al., 1998).

Effekte von Oleinsäure und Cerulenin auf die Replikation des Poliovirus

Um den Effekt der Synthese und Verwendbarkeit von intrazellulären Membranen auf die RNA-Replikation von Poliovirus zu untersuchen, wurde in früheren Arbeiten die Zusammensetzung der zellulären Membranen verändert (Guinea und Carrasco, 1991) und die Neusynthese von Phospholipiden inhibiert (Guinea und Carrasco, 1990). Die Zusammensetzung der zellulären Membranen wurde verändert durch die Inkubation der Zellkulturen mit Oleinsäure, einer mehrfach ungesättigten Fettsäure, die zu erhöhter Fluidität und geringerer Dichte aller zellulären Membranen führt. Nach dieser Behandlung konnte eine deutliche Reduktion der viralen RNA-Synthese beobachtet werden, die mit einer fast vollständigen Desintegration der Membranen des ER einherging (Guinea und Carrasco, 1991). Dies zeigt nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, daß durch die Desintegration des ER wahrscheinlich die Bildung der Poliovirus-Vesikel durch den COPII-Coat an den ER-Membranen nicht mehr stattfinden kann und dies zur Inhibition der RNA-Replikation führt. Um die Frage zu klären, ob Poliovirus zur Bildung der viralen Vesikel ausschließlich auf vorhandene zelluläre Membranen zurückgreift, oder auf eine Neusynthese von Membranmaterial angewiesen ist, wurde in einer weiteren Arbeit von Guinea und Carrasco (1990) die Neusynthese von Phospholipiden durch die Inkubation Poliovirus-infizierter Zellen mit der Substanz Cerulenin inhibiert. Cerulenin inhibierte die Translation der Poliovirus-RNA wenn es zu Beginn der Infektion zu den Zellen gegeben wurde. Die Inhibition der RNA-Replikation des Poliovirus durch die Zugabe von Cerulenin zu Zellkulturen, in denen die Replikation des Poliovirus bereits angelaufen war, zeigte, daß die kontinuierliche Synthese der Poliovirus-Vesikel zumindest zum Teil die Neusynthese von Phospholipiden involvierte (Guinea und Carrasco, 1990).

4.8. Die Prozesse der Translation, der Bildung der Vesikel und die Bildung des Replikationskomplex des Poliovirus finden an den gleichen zellulären Membranen statt

Die Voraussetzung für die RNA-Replikation des Poliovirus ist die vorherige Synthese viraler Proteine (Translation), welche essentiell für die virale RNA-Replikation sind, aber nicht im Kapsid des Virus enthalten sind. Bisher konnte noch nicht bewiesen werden, ob die Translation der viralen RNA an ER-Membrangebundenen Ribosomen oder an freien Ribosomen im Cytoplasma durchgeführt wird (Egger et al., 2001). Allerdings gibt es einige Hinweise, die auf eine membrangebundene Translation der Poliovirus-RNA schließen lassen. In frühen Versuchen zur Analyse der Funktion der cytoplasmatischen Membranen in der Poliovirus-Replikation - lange bevor der Aufbau eines membrangebundenen Replikationskomplex bekannt war - wurde einzelsträngige Poliovirus-RNA überwiegend assoziiert mit den Membranen des ER, aber nicht in cytosolischen Zellfraktionen gefunden (Caligiuri und Tamm, 1970; 1970). Nach dem Aufschluß der Membranen durch Detergenzien, wurden durch Sucrose-Gradientenzentrifugation Partikel in

dieser Fraktion gefunden, die Eigenschaften von Polysomen aufwiesen (Caligiuri und Tamm, 1970; 1970). Die Anwesenheit von membrangebundenen Polysomen, die die Poliovirus-RNA translatieren, konnte später für Poliovirus-infizierte Zellen bestätigt werden (Roumiantzeff et al., 1971; 1971). Daraus wurde geschlossen, daß die Translation der Poliovirus-RNA an Ribosomen stattfinden, die mit den ER-Membranen assoziiert sind.

In unserer Arbeitsgruppe konnte kürzlich gezeigt werden, daß die Prozesse der viralen Translation, der Bildung der Poliovirus-Vesikel und der viralen RNA-Replikation gekoppelt sind (Egger et al., 2000). Dies wurde durch die Expression des viralen Proteins 2BC oder aller P2 und P3-Proteine des Poliovirus in Zellen demonstriert, die anschließend mit Poliovirus superinfiziert wurden. Durch die Expression dieser Proteine wurden Poliovirus-Vesikel gebildet, die jedoch nicht für den Aufbau von Replikationskomplexen des superinfizierenden Poliovirus verwendet werden konnten (Egger et al., 2000). Diese Ergebnisse wurden mit der Überexpression von zellulären, membranbindenden Proteinen bestätigt, da diese ebenfalls Veränderungen der ER-Membranen induzierten. Diese veränderten Membranen konnten in der folgenden Superinfektion mit Poliovirus weder in Poliovirus-Vesikel transferiert werden, noch zum Aufbau viraler Replikationskomplexe verwendet werden (Egger et al., 2000). Zellen, in denen zuvor Poliovirus-Vesikel oder andere Membranveränderungen induziert worden waren, wurden dadurch weniger empfänglich für die folgende Superinfektion mit Poliovirus. Daraus wurde abgeleitet, daß die Menge der Membranen die in den Zellen für die Bildung eines viralen Replikationskomplexes zur Verfügung stehen, limitiert ist (Egger et al., 2000). Die Ergebnisse dieser Autoren zeigten, daß die Bildung des viralen Replikationskomplexes in cis geschieht. Das bedeutet, daß virale Translation, die Veränderungen der Membranen bzw. die Bildung der Poliovirus-Vesikel und die virale RNA-Replikation einen gekoppelten Prozeß darstellen. Also können die Membranen der Poliovirus-Vesikel nur für den Aufbau eines Replikationskomplexes verwendet werden, wenn diese von den Proteinen der gleichen RNA translatiert wurden, die später im Replikationskomplex repliziert wird (Egger et al., 2000). Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit einer Reihe weiterer Beobachtungen, wie z.B. das die Replikation der Poliovirus-RNA erst stattfinden kann, nachdem diese translatiert worden ist (Novak und Kirkegaard, 1994). Weiterhin wurde demonstriert, daß die RNA des Poliovirus nur nach der ununterbrochenen Translation der P2 und P3 Proteine repliziert werden konnte (Paul et al., 1998) und das die viralen Nicht-Strukturproteine nach ihrer Translation direkt der Bildung des viralen Replikationskomplex zur Verfügung stehen müssen, damit sie ihre Funktion bei der viralen RNA-Replikation ausführen können (Collis et al., 1992). Das an den ersten Vesikel-Clusters RNA-Synthese stattfinden kann, wurde von Bienz et al. (1987) durch den autoradiographischen Nachweis neu synthetisierter RNA auf Dünnschnitten im Elektronenmikroskop gezeigt. Der Aufbau funktioneller Poliovirus-Replikationskomplexe ist nur bei der Anwesenheit von aktiv replizierender viraler RNA möglich, da durch die Blockierung der RNA-Synthese der Aufbau des Replikationskomplexes nicht möglich war (Egger et al., 2001). Dabei war es unerheblich, ob

dieser Prozeß durch die Inhibition der viralen RNA-Synthese durch Mutationen (Egger et al., 2000) oder Guanidin-Hydrochlorid (Teterina et al., 2001) inhibiert wurde. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß nach der Translation der viralen RNA die Vesikelbildung an den ER-Membranen durchgeführt wird, an denen zuvor die virale Translation stattfand. Die Bildung der Poliovirus-Vesikel führt zum Aufbau des viralen Replikationskomplexes, der die zuvor translatierte virale RNA und die zur Replikation der RNA benötigten Proteine enthält. Dieses virale Kompartiment ist von der zellulären Umgebung abgeschlossen, sodaß kein Austausch von Makromolekülen mit der Umgebung stattfinden kann (Etchison und Ehrenfeld, 1981; Bienz et al., 1992) und bildet daher ein geeignetes Umfeld für die effiziente RNA-Replikation des Poliovirus.

4.9. Modell der Entstehung des membrangebundenen Poliovirus-Replikationskomplex

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse haben zu einem besseren Verständnis der Entstehung des membrangebundenen Replikationskomplex des Poliovirus beigetragen und führen zu neuen Hypothesen über die Mechanismen der frühen Prozesse während der Poliovirus-Replikation. Im folgenden Abschnitt wird auf der Basis der vorangegangenen Diskussion dieser Ergebnisse und unter Berücksichtigung des bisherigen Wissens über den Aufbau des Poliovirus-Replikationskomplex ein mögliches Modell für diesen Prozeß dargestellt.

Nachdem das Poliovirus von der Zelle aufgenommen wurde und das virale RNA-Genom durch das „Uncoating“ frei im Cytoplasma der Wirtszelle vorliegt, beginnt die Synthese der viralen Proteine durch die interne Translationsinitiation an der IRES der 5'-NTR der Poliovirus RNA (Pelletier und Sonenberg, 1988). Wahrscheinlich findet die Translation der viralen RNA an Ribosomen statt, die an den Membranen des ER gebunden sind (Roumiantzeff et al., 1971). Das virale Polyprotein wird ko- und posttranslational in die Precursor und reifen Proteine prozessiert. Die viralen Nichtstrukturproteine können sowohl als Precursor als auch in der Form reifer Proteine mit den Membranen des ER assoziieren (Towner et al., 1998) und werden wahrscheinlich an den Bereichen der ER-Membranen konzentriert, an denen sie synthetisiert wurden. Die Bildung der Poliovirus-Vesikel führt zusammen mit den Nichtstrukturproteinen zum Aufbau des Poliovirus-Replikationskomplex, in dem die Replikation der viralen RNA durchgeführt wird.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß zur Bildung der Poliovirus-Vesikel an den Membranen des ER die COPII-Proteine an den Bereichen rekrutiert werden, an denen das Protein 2BC bereits vorliegt. Wahrscheinlich wird diese Rekrutierung des COPII-Coat durch eine hohe Affinität des 2BC zu den zellulären COPII-Proteinen ausgelöst. Die Bildung der Poliovirus-Vesikel erfolgt also durch den zellulären COPII-Coat, homolog zur Bildung der anterograden Transportvesikel.

Das Protein 2BC könnte bei der Bildung der Poliovirus-Vesikel die Funktion eines Priming-Proteins ausüben, das durch Interaktionen mit dem Protein Sar1 oder dem Sec23-Komplex die Bindung des COPII-Coat an den Membranen des ER reguliert. Eine zweite mögliche Funktion des Proteins 2BC bei der Bildung der Poliovirus-Vesikel wäre eine Substitution des COPII-Proteins Sar1, für das bei anterograden Transportvesikeln gezeigt wurde, daß es als erstes Protein des COPII-Coat an die Membranen des ER bindet und durch seine GTPase-Funktion den Aufbau und die Dissoziation des COPII-Coats reguliert (Matsuoka et al., 1998). Bei anterograden Transportvesikeln führt eine Inhibition der GTPase-Funktion des Sar1 zur Stabilisierung des COPII-Coat, die die Fusion der Vesikel mit anderen zellulären Kompartimenten blockiert (Antonny et al., 2001). Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde vermutet, daß die Akkumulation der Poliovirus-Vesikel im Cytoplasma (Dales et al., 1965; Bienz et al., 1987) auf eine mögliche Stabilisierung des COPII-Coat auf den Poliovirus-Vesikeln zurückzuführen ist. Diese Hypothese ist kompatibel mit einer Inhibition der GTPase-Aktivität des Sar1 oder mit einer Substitution des Proteins Sar1 durch 2BC. Die Akkumulation der Poliovirus-Vesikel führt zum Aufbau des Replikationskomplexes, in dem die Prozesse der Replikation der viralen RNA stattfinden. Die Bildung der Poliovirus-Vesikel durch den COPII-Coat und die Akkumulation der Poliovirus-Vesikel im Cytoplasma führen wahrscheinlich zur Blockierung des zellulären anterograden Transports, was in den späten Phasen der Infektion zur beschriebenen Desintegration der Zellorganellen des sekretorischen Transportwegs (Golgi-Apparat und ER) (Bienz et al., 1983; 1994; Bolten et al., 1998) und zum Absterben der infizierten Zellen führt.

Diese Eigenschaft macht das Protein 2BC zu einem interessanten Werkzeug um die Prozesse des zellulären anterograden Transports näher zu untersuchen. Die Funktion des Poliovirus-Proteins 2BC ist also ein Ergebnis der Evolution spezifischer Interaktionen von Viren mit ihren Wirtszellen.

Die Verwendung des COPII-Mechanismus zur Produktion der viralen Vesikel während der Poliovirus-Infektion ist ein Beispiel für die Reduktion der Größe des Poliovirus-Genoms, die ein Selektionsvorteil in der Evolution des Virus darstellt, da durch die geringere Größe eine schnellere Vermehrung des Virus möglich ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten zeigen, daß durch ein einziges Polivirus-Protein (2BC) der komplexe zelluläre Prozess der Bildung von anterograden Transportvesikeln reguliert wird. Die Zelle wird dadurch zur Produktion eines Kompartiments angeregt, in dem der virale Replikationskomplex aufgebaut wird.

5. Literatur

- Agol, V. I., Belov, G. A., Bienz, K., Egger, D., Kolesnikova, M. S., Raikhlin, N. T., Romanova, L. I., Smirnova, E. A. & Tolskaya, E. A. (1998). Two types of death of poliovirus-infected cells: caspase involvement in the apoptosis but not cytopathic effect. *Virology* 252, 343-53.
- Aldabe, R. & Carrasco, L. (1995). Induction of membrane proliferation by poliovirus proteins 2C and 2BC. *Biochem Biophys Res Commun* 206, 64-76.
- Alvarez, C., Fujita, H., Hubbard, A. & Sztul, E. (1999). ER to Golgi transport: Requirement for p115 at a pre-Golgi VTC stage. *J Cell Biol* 147, 1205-22.
- Alvarez, C. I., Garcia-Mata, R., Hauri, H. P. & Sztul, E. S. (2000). The p115-interactive proteins, GM130 and giantin participate in ER- Golgi traffic. *J Biol Chem* 275, 16.
- Antonny, B., Madden, D., Hamamoto, S., Orci, L. & Schekman, R. (2001). Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues. *Nat Cell Biol* 3, 531-7.
- Aridor, M. & Balch, W. E. (1996). Principles of selective transport: coat complexes hold the key. *Trends in Cell Biology* 6, 315-320.
- Aridor, M. & Balch, W. E. (2000). Kinase signaling initiates coat complex II (COPII) recruitment and export from the mammalian endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 275, 35673-6.
- Aridor, M., Bannykh, S. I., Rowe, T. & Balch, W. E. (1999). Cargo can modulate COPII vesicle formation from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 274, 4389-99.
- Aridor, M., Fish, K. N., Bannykh, S., Weissman, J., Roberts, T. H., Lippincott-Schwartz, J. & Balch, W. E. (2001). The Sar1 GTPase Coordinates Biosynthetic Cargo Selection with Endoplasmic Reticulum Export Site Assembly. *J Cell Biol* 152, 213-230.
- Aridor, M., Weissman, J., Bannykh, S., Nuoffer, C. & Balch, W. E. (1998). Cargo selection by the COPII budding machinery during export from the ER. *J Cell Biol* 141, 61-70.
- Baker, D., Hicke, L., Rexach, M., Schleyer, M. & Schekman, R. (1988). Reconstitution of SEC gene product-dependent intercompartmental protein transport. *Cell* 54, 335-44.
- Balch, W. E., Dunphy, W. G., Braell, W. A. & Rothman, J. E. (1984). Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of N- acetylglucosamine. *Cell* 39, 405-16.
- Balch, W. E., McCaffery, J. M., Plutner, H. & Farquhar, M. G. (1994). Vesicular stomatitis virus glycoprotein is sorted and concentrated during export from the endoplasmic reticulum. *Cell* 76, 841-52.
- Bannykh, S. I. & Balch, W. E. (1998). Selective transport of cargo between the endoplasmic reticulum and Golgi compartments. *Histochem Cell Biol* 109, 463-75.
- Barco, A. & Carrasco, L. (1995). A human virus protein, poliovirus protein 2BC, induces membrane proliferation and blocks the exocytic pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 14, 3349-64.
- Barlowe, C. (1998). COPII and selective export from the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1404, 67-76.
- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M. F., Ravazzola, M., Amherdt, M. & Schekman, R. (1994). COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* 77, 895-907.
- Barton, D. J., Black, E. P. & Flanagan, J. B. (1995). Complete replication of poliovirus in vitro: preinitiation RNA replication complexes require soluble cellular factors for the synthesis of VPg-linked RNA. *J Virol* 69, 5516-27.

- Belnap, D. M., Filman, D. J., Trus, B. L., Cheng, N., Booy, F. P., Conway, J. F., Curry, S., Hiremath, C. N., Tsang, S. K., Steven, A. C. & Hogle, J. M. (2000). Molecular tectonic model of virus structural transitions: the putative cell entry states of poliovirus. *J Virol* 74, 1342-54.
- Belsham, G. J. (1992). Dual initiation sites of protein synthesis on foot-and-mouth disease virus RNA are selected following internal entry and scanning of ribosomes in vivo. *Embo J* 11, 1105-10.
- Bernstein, H. D., Sarnow, P. & Baltimore, D. (1986). Genetic complementation among poliovirus mutants derived from an infectious cDNA clone. *J Virol* 60, 1040-9.
- Bienz, K., Egger, D., Bienz-Isler, G. & Loeffler, H. (1972). Light and electron microscopic autoradiography of coxsackievirus A 1 infected muscles: viral RNA synthesis and inhibition of host cell RNA synthesis. *Arch Gesamte Virusforsch* 39, 35-47.
- Bienz, K., Egger, D. & Pasamontes, L. (1987). Association of polioviral proteins of the P2 genomic region with the viral replication complex and virus-induced membrane synthesis as visualized by electron microscopic immunocytochemistry and autoradiography. *Virology* 160, 220-6.
- Bienz, K., Egger, D. & Pfister, T. (1994). Characteristics of the poliovirus replication complex. *Arch Virol Suppl* 9, 147-57.
- Bienz, K., Egger, D., Pfister, T. & Troxler, M. (1992). Structural and functional characterization of the poliovirus replication complex. *J Virol* 66, 2740-7.
- Bienz, K., Egger, D., Rasser, Y. & Bossart, W. (1983). Intracellular distribution of poliovirus proteins and the induction of virus-specific cytoplasmic structures. *Virology* 131, 39-48.
- Bienz, K., Egger, D., Troxler, M. & Pasamontes, L. (1990). Structural organization of poliovirus RNA replication is mediated by viral proteins of the P2 genomic region. *J Virol* 64, 1156-63.
- Bienz, K., Egger, D. & Wolff, D. A. (1973). Virus replication, cytopathology, and lysosomal enzyme response of mitotic and interphase Hep-2 cells infected with poliovirus. *J Virol* 11, 565-74.
- Bitplane-AG (2000a). Bitplanes Colocalisation Manual / Colocalisation 1.2 Extension. Zürich: Bitplane AG, Zürich, Schweiz.
- Bitplane-AG (2000b). Imaris manual - Imaris 2.1/3.0. Zürich: Bitplane AG, Zürich, Schweiz.
- Bolten, R., Egger, D., Gosert, R., Schaub, G., Landmann, L. & Bienz, K. (1998). Intracellular localization of poliovirus plus- and minus-strand RNA visualized by strand-specific fluorescent In situ hybridization. *J Virol* 72, 8578-85.
- Bonfanti, L., Mironov, A. A., Jr., Martinez-Menarguez, J. A., Martella, O., Fusella, A., Baldassarre, M., Buccione, R., Geuze, H. J., Mironov, A. A. & Luini, A. (1998). Procollagen traverses the Golgi stack without leaving the lumen of cisternae: evidence for cisternal maturation. *Cell* 95, 993-1003.
- Brack, K., Frings, W., Dotzauer, A. & Vallbracht, A. (1998). A cytopathogenic, apoptosis-inducing variant of hepatitis A virus. *J Virol* 72, 3370-6.
- Brelje, T. C., Wessendorf, M. W. & Sorenson, R. L. (1993). Multicolor laser scanning confocal immunofluorescence microscopy: practical application and limitations. *Methods Cell Biol* 38, 97-181.
- Caligiuri, L. A. & Tamm, I. (1970a). Characterization of poliovirus-specific structures associated with cytoplasmic membranes. *Virology* 42, 112-22.
- Caligiuri, L. A. & Tamm, I. (1970b). The role of cytoplasmic membranes in poliovirus biosynthesis. *Virology* 42, 100-11.
- Campbell, J. L. & Schekman, R. (1997). Selective packaging of cargo molecules into endoplasmic reticulum- derived COPII vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 837-42.
- Centonze, V. & Pawley, J. (1995). Tutorial on practical confocal microscopy and use of the confocal test specimen. In *Handbook of biological confocal microscopy*, pp. 549-568. Edited by J. Pawley. New York, London: Plenum Press.
- Chardin, P. & McCormick, F. (1999). Brefeldin A: the advantage of being uncompetitive. *Cell* 97, 153-5.

- Charini, W. A., Burns, C. C., Ehrenfeld, E. & Semler, B. L. (1991). trans rescue of a mutant poliovirus RNA polymerase function. *J Virol* 65, 2655-65.
- Chijiwa, T., Mishima, A., Hagiwara, M., Sano, M., Hayashi, K., Inoue, T., Naito, K., Toshioka, T. & Hidaka, H. (1990). Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5- isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J Biol Chem* 265, 5267-72.
- Cho, M. W., Teterina, N., Egger, D., Bienz, K. & Ehrenfeld, E. (1994). Membrane rearrangement and vesicle induction by recombinant poliovirus 2C and 2BC in human cells. *Virology* 202, 129-45.
- Christodoulou, C., Colbere-Garapin, F., Macadam, A., Taffs, L. F., Marsden, S., Minor, P. & Horaud, F. (1990). Mapping of mutations associated with neurovirulence in monkeys infected with Sabin 1 poliovirus revertants selected at high temperature. *J Virol* 64, 4922-9.
- Clague, M. J. (1998). Molecular aspects of the endocytic pathway. *Biochem J* 336, 271-82.
- Collis, P. S., O'Donnell, B. J., Barton, D. J., Rogers, J. A. & Flanagan, J. B. (1992). Replication of poliovirus RNA and subgenomic RNA transcripts in transfected cells. *J Virol* 66, 6480-8.
- Cox, K. H., DeLeon, D. V., Angerer, L. M. & Angerer, R. C. (1984). Detection of mrnas in sea urchin embryos by in situ hybridization using asymmetric RNA probes. *Dev Biol* 101, 485-502.
- Cuconati, A., Xiang, W., Lahser, F., Pfister, T. & Wimmer, E. (1998). A protein linkage map of the P2 nonstructural proteins of poliovirus. *J Virol* 72, 1297-307.
- Dales, S., Eggers, H. J., Tamm, I. & Palade, G. E. (1965). Electron microscopic study of the formation of poliovirus. *Virology* 26, 379-89.
- Dasgupta, A., Baron, M. H. & Baltimore, D. (1979). Poliovirus replicase: a soluble enzyme able to initiate copying of poliovirus RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 2679-83.
- De Silvestris, M., D'Arrigo, A. & Borgese, N. (1995). The targeting information of the mitochondrial outer membrane isoform of cytochrome b5 is contained within the carboxyl-terminal region. *FEBS Lett* 370, 69-74.
- Demandolx, D., Barois, N. & Davoust, J. (1997). Guidelines for multifuorescence confocal imaging: acquisition, processing and display. *Europ Micro Anal* 7, 5-7.
- Demandolx, D. & Davoust, J. (1995). Multicolor analysis in confocal immunofluorescence microscopy. *J Trace Micro Tech* 13, 217-225.
- Demandolx, D. & Davoust, J. (1997). Multicolour analysis and local image correlation in confocal microscopy. *J Microscopy* 185, 21-36.
- Dinter, A. & Berger, E. G. (1998). Golgi-disturbing agents. *Histochem Cell Biol* 109, 571-90.
- Dodd, D. A., Giddings, T. H., Jr. & Kirkegaard, K. (2001). Poliovirus 3A protein limits interleukin-6 (IL-6), IL-8, and beta interferon secretion during viral infection. *J Virol* 75, 8158-65.
- Doedens, J., Maynell, L. A., Klymkowsky, M. W. & Kirkegaard, K. (1994). Secretory pathway function, but not cytoskeletal integrity, is required in poliovirus infection. *Arch Virol Suppl* 9, 159-72.
- Donaldson, J. G. & Klausner, R. D. (1994). ARF: a key regulatory switch in membrane traffic and organelle structure. *Curr Opin Cell Biol* 6, 527-32.
- Echeverri, A., Banerjee, R. & Dasgupta, A. (1998). Amino-terminal region of poliovirus 2C protein is sufficient for membrane binding. *Virus Res* 54, 217-23.
- Echeverri, A. C. & Dasgupta, A. (1995). Amino terminal regions of poliovirus 2C protein mediate membrane binding. *Virology* 208, 540-53.

- Egger, D., Bolten, R., Rahner, C. & Bienz, K. (1999). Fluorochrome-labeled RNA as a sensitive, strand-specific probe for direct fluorescence in situ hybridization. *Histochem Cell Biol* 111, 319-24.
- Egger, D., Gosert, R. & Bienz, K. (2001). Role of cellular structures in viral RNA replication. In *Molecular Biology of Picornaviruses*. Edited by B. Semler & E. Wimmer. New York: in press.
- Egger, D., Pasamontes, L., Bolten, R., Boyko, V. & Bienz, K. (1996). Reversible dissociation of the poliovirus replication complex: functions and interactions of its components in viral RNA synthesis. *J Virol* 70, 8675-83.
- Egger, D., Teterina, N., Ehrenfeld, E. & Bienz, K. (2000). Formation of the poliovirus replication complex requires coupled viral translation, vesicle production, and viral RNA synthesis. *J Virol* 74, 6570-80.
- Ellgaard, L. & Helenius, A. (2001). ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr Opin Cell Biol* 13, 431-7.
- Enders, J. F. (1955). Developments in tissue culture. In *Poliomyelitis: papers and discussions presented at the third international poliomyelitis conference.*, pp. 221-223. Philadelphia: Lippincott.
- Espenshade, P., Gimeno, R. E., Holzmacher, E., Teung, P. & Kaiser, C. A. (1995). Yeast SEC16 gene encodes a multidomain vesicle coat protein that interacts with Sec23p. *J Cell Biol* 131, 311-24.
- Fields, B. N., Knipe, D. M. & Howley, P. M. (1996). *Virology*, 3rd. Edition Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
- Flint, S. J., Enquist, L. W., Krug, R. M., Racaniello, V. R. & Skalka, A. M. (2000). *Principles of Virology*. Washington D. C.: ASM Press.
- Frankel, G., Lorch, Y., Karlik, P. & Friedmann, A. (1987). Fractionation of Theiler's virus-infected BHK21 cell homogenates: isolation of virus-induced membranes. *Virology* 158, 452-5.
- Fuerst, T. R., Niles, E. G., Studier, F. W. & Moss, B. (1986). Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 8122-6.
- Gaire, F. (1999). Dissertation, Strassbourg.
- Gaire, F., Schmitt, C., Stussi-Garaud, C., Pinck, L. & Ritzenthaler, C. (1999). Protein 2A of grapevine fanleaf nepovirus is implicated in RNA2 replication and colocalizes to the replication site. *Virology* 264, 25-36.
- Gamarnik, A. V. & Andino, R. (1997). Two functional complexes formed by KH domain containing proteins with the 5' noncoding region of poliovirus RNA. *Rna* 3, 882-92.
- Gamarnik, A. V. & Andino, R. (1998). Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev* 12, 2293-304.
- Gaynor, E. C. & Emr, S. D. (1997). COPI-independent anterograde transport: cargo-selective ER to Golgi protein transport in yeast COPI mutants. *J Cell Biol* 136, 789-802.
- Gimeno, R. E., Espenshade, P. & Kaiser, C. A. (1995). SED4 encodes a yeast endoplasmic reticulum protein that binds Sec16p and participates in vesicle formation. *J Cell Biol* 131, 325-38.
- Gimeno, R. E., Espenshade, P. & Kaiser, C. A. (1996). COPII coat subunit interactions: Sec24p and Sec23p bind to adjacent regions of Sec16p. *Mol Biol Cell* 7, 1815-23.
- Girod, A., Storrie, B., Simpson, J. C., Johannes, L., Goud, B., Roberts, L. M., Lord, J. M., Nilsson, T. & Pepperkok, R. (1999). Evidence for a COP-I-independent transport route from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol* 1, 423-30.
- Glick, B. S. (2000). Organization of the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol* 12, 450-6.

- Gosert, R., Cassinotti, P., Siegl, G. & Weitz, M. (1996). Identification of hepatitis A virus non-structural protein 2B and its release by the major virus protease 3C. *J Gen Virol* 77, 247-55.
- Gosert, R., Egger, D. & Bienz, K. (2000). A cytopathic and a cell culture adapted hepatitis A virus strain differ in cell killing but not in intracellular membrane rearrangements. *Virology* 266, 157-69.
- Gottlieb, E. & Steitz, J. A. (1989). Function of the mammalian La protein: evidence for its action in transcription termination by RNA polymerase III. *Embo J* 8, 851-61.
- Griffiths, G., Ericsson, M., Krijnse-Locker, J., Nilsson, T., Goud, B., Soling, H. D., Tang, B. L., Wong, S. H. & Hong, W. (1994). Localization of the Lys, Asp, Glu, Leu tetrapeptide receptor to the Golgi complex and the intermediate compartment in mammalian cells. *J Cell Biol* 127, 1557-74.
- Gromeier, M., Bossert, B., Arita, M., Nomoto, A. & Wimmer, E. (1999). Dual stem loops within the poliovirus internal ribosomal entry site control neurovirulence. *J Virol* 73, 958-64.
- Guinea, R. & Carrasco, L. (1990). Phospholipid biosynthesis and poliovirus genome replication, two coupled phenomena. *Embo J* 9, 2011-6.
- Guinea, R. & Carrasco, L. (1991). Effects of fatty acids on lipid synthesis and viral RNA replication in poliovirus-infected cells. *Virology* 185, 473-6.
- Haerri, E., Loeffler, W., Sigg, H. P., Staehelin, H. & Tamm, C. (1963). Über die Isolierung neuer Stoffwechselprodukte aus *Penicillium brefeldianum* DODGE. *Helv Chim Acta* 46, 1235-1243.
- Haller, A. A. & Semler, B. L. (1992). Linker scanning mutagenesis of the internal ribosome entry site of poliovirus RNA. *J Virol* 66, 5075-86.
- Hauri, H., Appenzeller, C., Kuhn, F. & Nufer, O. (2000a). Lectins and traffic in the secretory pathway. *FEBS Lett* 476, 32-7.
- Hauri, H. P., Kappeler, F., Andersson, H. & Appenzeller, C. (2000b). ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway. *J Cell Sci* 113, 587-96.
- Hauri, H. P. & Schweizer, A. (1992). The endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment. *Curr Opin Cell Biol* 4, 600-8.
- Herold, J. & Andino, R. (2001). Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol Cell* 7, 581-91.
- Hogle, J. M., Chow, M. & Filman, D. J. (1985). Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science* 229, 1358-65.
- Holland, J. J., De La Torre, J. C. & Steinhauer, D. A. (1992). RNA virus populations as quasispecies. *Curr Top Microbiol Immunol* 176, 1-20.
- Hong, W. (1998). Protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *J. Cell Sci* 111, 2831-2839.
- Hunziker, W., Whitney, J. A. & Mellman, I. (1991). Selective inhibition of transcytosis by brefeldin A in MDCK cells. *Cell* 67, 617-27.
- Irurzun, A., Arroyo, J., Alvarez, A. & Carrasco, L. (1995). Enhanced intracellular calcium concentration during poliovirus infection. *J Virol* 69, 5142-6.
- Irurzun, A., Perez, L. & Carrasco, L. (1992). Involvement of membrane traffic in the replication of poliovirus genomes: effects of brefeldin A. *Virology* 191, 166-75.
- Jackson, R. J., Hunt, S. L., Gibbs, C. L. & Kaminski, A. (1994). Internal initiation of translation of picornavirus RNAs. *Mol Biol Rep* 19, 147-59.
- Jamora, C., Yamanouye, N., Van Lint, J., Laudenslager, J., Vandenheede, J. R., Faulkner, D. J. & Malhotra, V. (1999). Gbetagamma-mediated regulation of Golgi organization is through the direct activation of protein kinase D. *Cell* 98, 59-68.
- Jang, S. K., Pestova, T. V., Hellen, C. U., Witherell, G. W. & Wimmer, E. (1990). Cap-independent translation of picornavirus RNAs: structure and function of the internal ribosomal entry site. *Enzyme* 44, 292-309.
- Joachims, M. & Etchison, D. (1992). Poliovirus infection results in structural alteration of a microtubule-associated protein. *J Virol* 66, 5797-804.

Literatur

- Joachims, M., Harris, K. S. & Etchison, D. (1995). Poliovirus protease 3C mediates cleavage of microtubule-associated protein 4. *Virology* 211, 451-61.
- Johnson, A. E. & van Waes, M. A. (1999). The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 799-842.
- Johnson, K. L. & Sarnow, P. (1991). Three poliovirus 2B mutants exhibit noncomplementable defects in viral RNA amplification and display dosage-dependent dominance over wild-type poliovirus. *J Virol* 65, 4341-9.
- Kaiser, C. A. & Schekman, R. (1990). Distinct sets of SEC genes govern transport vesicle formation and fusion early in the secretory pathway. *Cell* 61, 723-33.
- Kaminski, A., Belsham, G. J. & Jackson, R. J. (1994). Translation of encephalomyocarditis virus RNA: parameters influencing the selection of the internal initiation site. *Embo J* 13, 1673-81.
- Katsumoto, T., Inoue, M., Naguro, T. & Kurimura, T. (1991). Association of cytoskeletons with the Golgi apparatus: three-dimensional observation and computer-graphic reconstruction. *J Electron Microsc (Tokyo)* 40, 24-8.
- Kawamura, N., Kohara, M., Abe, S., Komatsu, T., Tago, K., Arita, M. & Nomoto, A. (1989). Determinants in the 5' noncoding region of poliovirus Sabin 1 RNA that influence the attenuation phenotype. *J Virol* 63, 1302-9.
- Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J. & Zinkernagel, R. M. (2001). *Medizinische Mikrobiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Kitamura, N., Semler, B. L., Rothberg, P. G., Larsen, G. R., Adler, C. J., Dorner, A. J., Emini, E. A., Hanecak, R., Lee, J. J., van der Werf, S., Anderson, C. W. & Wimmer, E. (1981). Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature* 291, 547-53.
- Klopfenstein, D. R., Kappeler, F. & Hauri, H. P. (1998). A novel direct interaction of endoplasmic reticulum with microtubules. *Embo J* 17, 6168-77.
- Klopfenstein, D. R., Klumperman, J., Lustig, A., Kammerer, R. A., Oorschot, V. & Hauri, H. P. (2001). Subdomain-specific localization of CLIMP-63 (p63) in the endoplasmic reticulum is mediated by its luminal alpha-helical segment. *J Cell Biol* 153, 1287-300.
- Klumperman, J. (2000). Transport between ER and Golgi. *Curr Opin Cell Biol* 12, 445-9.
- Koch, F. & Koch, G. (1985). *The molecular biology of Poliovirus*. Wien: Springer Verlag.
- Krijnse-Locker, J., Ericsson, M., Rottier, P. J. & Griffiths, G. (1994). Characterization of the budding compartment of mouse hepatitis virus: evidence that transport from the RER to the Golgi complex requires only one vesicular transport step. *J Cell Biol* 124, 55-70.
- Kuehn, M. J., Herrmann, J. M. & Schekman, R. (1998). COPII-cargo interactions direct protein sorting into ER-derived transport vesicles. *Nature* 391, 187-90.
- Kuhn, R. J., Tada, H., Ypma-Wong, M. F., Semler, B. L. & Wimmer, E. (1988). Mutational analysis of the genome-linked protein VPg of poliovirus. *J Virol* 62, 4207-15.
- Kuhn, R. J. & Wimmer, E. (1987). The replication of picornaviruses. In *The molecular biology of the positive strand RNA viruses*. Edited by D. J. Rowlands, A. M. Mayo & B. W. J. Mahy. London: Academic Press.
- Lahtinen, U., Dahllof, B. & Saraste, J. (1992). Characterization of a 58 kDa cis-Golgi protein in pancreatic exocrine cells. *J Cell Sci* 103, 321-33.
- Landmann, L. (2001). Image restoration improves colocalisation analysis of multiple fluorochroms in 3D data sets generated by confocal microscopy. *J Microsc in press*.
- Lavoie, C., Paiement, J., Dominguez, M., Roy, L., Dahan, S., Gushue, J. N. & Bergeron, J. J. (1999). Roles for alpha(2)p24 and COPI in endoplasmic reticulum cargo exit site formation. *J Cell Biol* 146, 285-99.

- Lee, T. H. & Linstedt, A. D. (2000). Potential role for protein kinases in regulation of bidirectional endoplasmic reticulum-to-Golgi transport revealed by protein kinase inhibitor H89. *Mol Biol Cell* 11, 2577-90.
- LeGrand, E. K. (2000). Implications of early apoptosis of infected cells as an important host defense. *Med Hypotheses* 54, 591-6.
- Li, J. P. & Baltimore, D. (1988). Isolation of poliovirus 2C mutants defective in viral RNA synthesis. *J Virol* 62, 4016-21.
- Linstedt, A. D., Foguet, M., Renz, M., Seelig, H. P., Glick, B. S. & Hauri, H. P. (1995). A C-terminally-anchored Golgi protein is inserted into the endoplasmic reticulum and then transported to the Golgi apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5102-5.
- Linstedt, A. D. & Hauri, H. P. (1993). Giantin, a novel conserved Golgi membrane protein containing a cytoplasmic domain of at least 350 kDa. *Mol Biol Cell* 4, 679-93.
- Linstedt, A. D., Jesch, S. A., Mehta, A., Lee, T. H., Garcia-Mata, R., Nelson, D. S. & Sztul, E. (2000). Binding relationships of membrane tethering components. The giantin N terminus and the GM130 N terminus compete for binding to the p115 C terminus. *J Biol Chem* 275, 10196-201.
- Lippincott-Schwartz, J. (1998). Cytoskeletal proteins and Golgi dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 10, 52-9.
- Lodish, H. F., Kong, N., Snider, M. & Strous, G. J. (1983). Hepatoma secretory proteins migrate from rough endoplasmic reticulum to Golgi at characteristic rates. *Nature* 304, 80-3.
- Löffler, F. & Frosch, P. (1964). Report of the commission for research on foot- and mouth- disease. In *Selected Papers on Virology*, pp. 6-68. Edited by N. Hahon. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall.
- Longin, A., Souchier, C., Ffrench, M. & Bryon, P. A. (1993). Comparison of anti-fading agents used in fluorescence microscopy: image analysis and laser confocal microscopy study. *J Histochem Cytochem* 41, 1833-40.
- Lowe, M. & Kreis, T. E. (1998). Regulation of membrane traffic in animal cells by COPI. *Biochim Biophys Acta* 1404, 53-66.
- Macejak, D. G. & Sarnow, P. (1991). Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. *Nature* 353, 90-4.
- Martinez, O., Antony, C., Pehau-Arnaudet, G., Berger, E. G., Salamero, J. & Goud, B. (1997). GTP-bound forms of rab6 induce the redistribution of Golgi proteins into the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1828-33.
- Matsuoka, K., Orci, L., Amherdt, M., Bednarek, S. Y., Hamamoto, S., Schekman, R. & Yeung, T. (1998). COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell* 93, 263-75.
- Maynell, L. A., Kirkegaard, K. & Klymkowsky, M. W. (1992). Inhibition of poliovirus RNA synthesis by brefeldin A. *J Virol* 66, 1985-94.
- Meerovitch, K., Svitkin, Y. V., Lee, H. S., Lejbkowitz, F., Kenan, D. J., Chan, E. K., Agol, V. I., Keene, J. D. & Sonenberg, N. (1993). La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of poliovirus RNA in reticulocyte lysate. *J Virol* 67, 3798-807.
- Mellman, I. & Simons, K. (1992). The Golgi complex: in vitro veritas? *Cell* 68, 829-40.
- Mendelsohn, C. L., Wimmer, E. & Racaniello, V. R. (1989). Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell* 56, 855-65.
- Mironov, A., Jr., Luini, A. & Mironov, A. (1998). A synthetic model of intra-Golgi traffic. *Faseb J* 12, 249-52.
- Mirzayan, C. & Wimmer, E. (1992). Genetic analysis of an NTP-binding motif in poliovirus polypeptide 2C. *Virology* 189, 547-55.
- Molla, A., Paul, A. V., Schmid, M., Jang, S. K. & Wimmer, E. (1993). Studies on dicistronic polioviruses implicate viral proteinase 2Apro in RNA replication. *Virology* 196, 739-47.

- Molla, A., Paul, A. V. & Wimmer, E. (1991). Cell-free, de novo synthesis of poliovirus. *Science* 254, 1647-51.
- Moreau, V. & Way, M. (1999). In vitro approaches to study actin and microtubule dependent cell processes. *Curr Opin Cell Biol* 11, 152-8.
- Moscufo, N., Yafal, A. G., Rogove, A., Hogle, J. & Chow, M. (1993). A mutation in VP4 defines a new step in the late stages of cell entry by poliovirus. *J Virol* 67, 5075-8.
- Moss, B. (1990). Regulation of vaccinia virus transcription. *Annu Rev Biochem* 59, 661-88.
- Moss, E. G., O'Neill, R. E. & Racaniello, V. R. (1989). Mapping of attenuating sequences of an avirulent poliovirus type 2 strain. *J Virol* 63, 1884-90.
- Muniz, M., Martin, M. E., Hidalgo, J. & Velasco, A. (1997). Protein kinase A activity is required for the budding of constitutive transport vesicles from the trans-Golgi network. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14461-6.
- Nakano, A., Otsuka, H., Yamagishi, M., Yamamoto, E., Kimura, K., Nishikawa, S. & Oka, T. (1994). Mutational analysis of the Sar1 protein, a small GTPase which is essential for vesicular transport from the endoplasmic reticulum. *J Biochem (Tokyo)* 116, 243-7.
- Nichols, B. J. & Pelham, H. R. (1998). SNAREs and membrane fusion in the Golgi apparatus. *Biochim Biophys Acta* 1404, 9-31.
- Nilsson, T., Pypaert, M., Hoe, M. H., Slusarewicz, P., Berger, E. G. & Warren, G. (1993). Overlapping distribution of two glycosyltransferases in the Golgi apparatus of HeLa cells. *J Cell Biol* 120, 5-13.
- Nilsson, T. & Warren, G. (1994). Retention and retrieval in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol* 6, 517-21.
- Novak, J. E. & Kirkegaard, K. (1991). Improved method for detecting poliovirus negative strands used to demonstrate specificity of positive-strand encapsidation and the ratio of positive to negative strands in infected cells. *J Virol* 65, 3384-7.
- Novak, J. E. & Kirkegaard, K. (1994). Coupling between genome translation and replication in an RNA virus. *Genes Dev* 8, 1726-37.
- Nuss, D. L., Oppermann, H. & Koch, G. (1975). Selective blockage of initiation of host protein synthesis in RNA-virus- infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 1258-62.
- Oh, S. K., Scott, M. P. & Sarnow, P. (1992). Homeotic gene *Antennapedia* mRNA contains 5'-noncoding sequences that confer translational initiation by internal ribosome binding. *Genes Dev* 6, 1643-53.
- Orci, L., Amherdt, M., Ravazzola, M., Perrelet, A. & Rothman, J. E. (2000). Exclusion of golgi residents from transport vesicles budding from Golgi cisternae in intact cells. *J Cell Biol* 150, 1263-70.
- Orci, L., Malhotra, V., Amherdt, M., Serafini, T. & Rothman, J. E. (1989). Dissection of a single round of vesicular transport: sequential intermediates for intercisternal movement in the Golgi stack. *Cell* 56, 357-68.
- Orci, L., Stamnes, M., Ravazzola, M., Amherdt, M., Perrelet, A., Sollner, T. H. & Rothman, J. E. (1997). Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles. *Cell* 90, 335-49.
- Paddock, S. W. (1999). Confocal Microscopy. In: *Methods in Molecular Biology*. Totowa: Humana Press.
- Pasamontes, L., Egger, D. & Bienz, K. (1986). Production of monoclonal and monospecific antibodies against non-capsid proteins of poliovirus. *J Gen Virol* 67, 2415-22.
- Paul, A. V., Molla, A. & Wimmer, E. (1994). Studies of a putative amphipathic helix in the N-terminus of poliovirus protein 2C. *Virology* 199, 188-99.
- Paul, A. V., Mugavero, J., Molla, A. & Wimmer, E. (1998a). Internal ribosomal entry site scanning of the poliovirus polyprotein: implications for proteolytic processing. *Virology* 250, 241-53.

- Paul, A. V., van Boom, J. H., Filippov, D. & Wimmer, E. (1998b). Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature* 393, 280-4.
- Pelletier, J. & Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334, 320-5.
- Peyroche, A., Antony, B., Robineau, S., Acker, J., Cherfils, J. & Jackson, C. L. (1999). Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Mol Cell* 3, 275-85.
- Pfister, T., Jones, K. W. & Wimmer, E. (2000). A cysteine-rich motif in poliovirus protein 2C(ATPase) is involved in RNA replication and binds zinc in vitro. *J Virol* 74, 334-43.
- Pfister, T. & Wimmer, E. (1999). Characterization of the nucleoside triphosphatase activity of poliovirus protein 2C reveals a mechanism by which guanidine inhibits poliovirus replication. *J Biol Chem* 274, 6992-7001.
- Pincus, S. E., Diamond, D. C., Emini, E. A. & Wimmer, E. (1986). Guanidine-selected mutants of poliovirus: mapping of point mutations to polypeptide 2C. *J Virol* 57, 638-46.
- Pincus, S. E. & Wimmer, E. (1986). Production of guanidine-resistant and -dependent poliovirus mutants from cloned cDNA: mutations in polypeptide 2C are directly responsible for altered guanidine sensitivity. *J Virol* 60, 793-6.
- Ploubidou, A. & Way, M. (2001). Viral transport and the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 13, 97-105.
- Plutner, H., Davidson, H. W., Saraste, J. & Balch, W. E. (1992). Morphological analysis of protein transport from the ER to Golgi membranes in digitonin-permeabilized cells: role of the P58 containing compartment. *J Cell Biol* 119, 1097-116.
- Potter, M. D. & Nicchitta, C. V. (2000). Regulation of ribosome detachment from the mammalian endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* 275, 33828-35.
- Potter, M. D., Seiser, R. M. & Nicchitta, C. V. (2001). Ribosome exchange revisited: a mechanism for translation-coupled ribosome detachment from the ER membrane. *Trends Cell Biol* 11, 112-5.
- Pound, J. D. (1998). *Immunochemical Protocols*. In *Methods in Molecular Biology*. Totowa: Humana Press.
- Presley, J. F., Cole, N. B., Schroer, T. A., Hirschberg, K., Zaal, K. J. & Lippincott-Schwartz, J. (1997). ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* 389, 81-5.
- Racaniello, V. R. & Baltimore, D. (1981). Molecular cloning of poliovirus cDNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 4887-91.
- Rahner, C., Stieger, B. & Landmann, L. (2000). Apical Endocytosis in Rat Hepatocytes In Situ Involves Clathrin, Traverses a Subapical Compartment, and Leads to Lysosomes. *Gastroenterology* 119, 1692-1707.
- Reinhard, C., Harter, C., Bremser, M., Brugger, B., Sohn, K., Helms, J. B. & Wieland, F. (1999). Receptor-induced polymerization of coatamer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1224-8.
- Reynolds, J. E., Kaminski, A., Kettinen, H. J., Grace, K., Clarke, B. E., Carroll, A. R., Rowlands, D. J. & Jackson, R. J. (1995). Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation. *Embo J* 14, 6010-20.
- Roberg, K. J., Crotwell, M., Espenshade, P., Gimeno, R. & Kaiser, C. A. (1999). LST1 is a SEC24 homologue used for selective export of the plasma membrane ATPase from the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 145, 659-72.

- Rodriguez, P. L. & Carrasco, L. (1993). Poliovirus protein 2C has ATPase and GTPase activities. *J Biol Chem* 268, 8105-10.
- Rodriguez, P. L. & Carrasco, L. (1995). Poliovirus protein 2C contains two regions involved in RNA binding activity. *J Biol Chem* 270, 10105-12.
- Rothman, J. E. (1994). Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372, 55-63.
- Rothman, J. E. & Wieland, F. T. (1996). Protein sorting by transport vesicles. *Science* 272, 227-34.
- Roulston, A., Marcellus, R. C. & Branton, P. E. (1999). Viruses and apoptosis. *Annu Rev Microbiol* 53, 577-628.
- Roumiantzeff, M., Maizel, J. V., Jr. & Summers, D. F. (1971a). Comparison of polysomal structures of uninfected and poliovirus infected HeLa cells. *Virology* 44, 239-48.
- Roumiantzeff, M., Summers, D. F. & Maizel, J. V., Jr. (1971b). In vitro protein synthetic activity of membrane-bound poliovirus polyribosomes. *Virology* 44, 249-58.
- Rueckert, R. R. (1996). Picornaviridae: The viruses and their replication. In *Virology*, pp. 609-654. Edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley & e. al. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
- Rueckert, R. R. & Wimmer, E. (1984). Systematic nomenclature of picornavirus proteins. *J Virol* 50, 957-9.
- Sabin, A. B. & Boulger, L. R. (1973). History of Sabin attenuated poliovirus oral live vaccine strains. *J. Biol. Stand.* 1, 115-118.
- Salmons, T., Kuhn, A., Wylie, F., Schleich, S., Rodriguez, J. R., Rodriguez, D., Esteban, M., Griffiths, G. & Locker, J. K. (1997). Vaccinia virus membrane proteins p8 and p16 are cotranslationally inserted into the rough endoplasmic reticulum and retained in the intermediate compartment. *J Virol* 71, 7404-20.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1998). *Molecular Cloning*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandoval, I. V. & Carrasco, L. (1997). Poliovirus infection and expression of the poliovirus protein 2B provoke the disassembly of the Golgi complex, the organelle target for the antipoliovirus drug Ro-090179. *J Virol* 71, 4679-93.
- Saraste, J., Palade, G. E. & Farquhar, M. G. (1987). Antibodies to rat pancreas Golgi subfractions: identification of a 58- kD cis-Golgi protein. *J Cell Biol* 105, 2021-9.
- Saraste, J. & Svensson, K. (1991). Distribution of the intermediate elements operating in ER to Golgi transport. *J Cell Sci* 100, 415-30.
- Scales, S. J., Pepperkok, R. & Kreis, T. E. (1997). Visualization of ER-to-Golgi transport in living cells reveals a sequential mode of action for COPII and COPI. *Cell* 90, 1137-48.
- Scalettar, B. A., Sweldow, J. R., Sedat, J. W. & Agard, D. A. (1996). Dispersion, aberration and deconvolution in multi-wavelength fluorescence images. *J Microscopy* 182, 50-60.
- Scheel, J., Pepperkok, R., Lowe, M., Griffiths, G. & Kreis, T. E. (1997). Dissociation of coatmer from membranes is required for brefeldin A- induced transfer of Golgi enzymes to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 137, 319-33.
- Schekman, R. & Orci, L. (1996). Coat proteins and vesicle budding. *Science* 271, 1526-33.
- Schlegel, A., Giddings, T. H., Jr., Ladinsky, M. S. & Kirkegaard, K. (1996). Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection. *J Virol* 70, 6576-88.
- Schmid, M. & Wimmer, E. (1994). IRES-controlled protein synthesis and genome replication of poliovirus. *Arch Virol Suppl* 9, 279-89.

- Schultz, D. E., Honda, M., Whetter, L. E., McKnight, K. L. & Lemon, S. M. (1996). Mutations within the 5' nontranslated RNA of cell culture-adapted hepatitis A virus which enhance cap-independent translation in cultured African green monkey kidney cells. *J Virol* 70, 1041-9.
- Schwaninger, R., Beckers, C. J. & Balch, W. E. (1991). Sequential transport of protein between the endoplasmic reticulum and successive Golgi compartments in semi-intact cells. *J Biol Chem* 266, 13055-63.
- Schweizer, A., Fransen, J. A., Matter, K., Kreis, T. E., Ginsel, L. & Hauri, H. P. (1990). Identification of an intermediate compartment involved in protein transport from endoplasmic reticulum to Golgi apparatus. *Eur J Cell Biol* 53, 185-96.
- Schweizer, A., Rohrer, J., Slot, J. W., Geuze, H. J. & Kornfeld, S. (1995). Reassessment of the subcellular localization of p63. *J Cell Sci* 108, 2477-85.
- Scientific-Volume-Imaging (2000). *Huygens Manual - The Huygens System 2 Owner's Guide*. Hilversum, Niederlande: Scientific Volume Imaging b.v.
- Seelig, H. P., Schranz, P., Schroter, H., Wiemann, C., Griffiths, G. & Renz, M. (1994). Molecular genetic analyses of a 376-kilodalton Golgi complex membrane protein (giantin). *Mol Cell Biol* 14, 2564-76.
- Shaw, P. (1994). Deconvolution in 3-D optical microscopy. *Histochem J* 26, 687-694.
- Shaw, P. & Rawlins, D. J. (1991). The point-spread function of a confocal microscope: its measurement and use in deconvolution of 3-D data. *J Microscopy* 163, 151-165.
- Shimoni, Y., Kurihara, T., Ravazzola, M., Amherdt, M., Orci, L. & Schekman, R. (2000). Lst1p and Sec24p cooperate in sorting of the plasma membrane ATPase into COPII vesicles in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 151, 973-84.
- Sonnichsen, B., Fullekrug, J., Nguyen Van, P., Diekmann, W., Robinson, D. G. & Mieskes, G. (1994). Retention and retrieval: both mechanisms cooperate to maintain calreticulin in the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 107, 2705-17.
- Sonnichsen, B., Lowe, M., Levine, T., Jamsa, E., Dirac-Svejstrup, B. & Warren, G. (1998). A role for giantin in docking COPI vesicles to Golgi membranes. *J Cell Biol* 140, 1013-21.
- Spang, A., Matsuoka, K., Hamamoto, S., Schekman, R. & Orci, L. (1998). Coatamer, Arf1p, and nucleotide are required to bud coat protein complex I-coated vesicles from large synthetic liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11199-204.
- Springer, S. & Schekman, R. (1998). Nucleation of COPII vesicular coat complex by endoplasmic reticulum to Golgi vesicle SNAREs. *Science* 281, 698-700.
- Springer, S., Spang, A. & Schekman, R. (1999). A primer on vesicle budding. *Cell* 97, 145-8.
- Stinchcombe, J. C., Nomoto, H., Cutler, D. F. & Hopkins, C. R. (1995). Anterograde and retrograde traffic between the rough endoplasmic reticulum and the Golgi complex. *J Cell Biol* 131, 1387-401.
- Suhy, D. A., Giddings, T. H., Jr. & Kirkegaard, K. (2000). Remodeling the endoplasmic reticulum by poliovirus infection and by individual viral proteins: an autophagy-like origin for virus-induced vesicles. *J Virol* 74, 8953-65.
- Svitkin, Y. V., Cammack, N., Minor, P. D. & Almond, J. W. (1990). Translation deficiency of the Sabin type 3 poliovirus genome: association with an attenuating mutation C472----U. *Virology* 175, 103-9.
- Takeda, N., Kuhn, R. J., Yang, C. F., Takegami, T. & Wimmer, E. (1986). Initiation of poliovirus plus-strand RNA synthesis in a membrane complex of infected HeLa cells. *J Virol* 60, 43-53.
- Tang, B. L., Low, S. H. & Hong, W. (1995). Differential response of resident proteins and cycling proteins of the Golgi to brefeldin A. *Eur J Cell Biol* 68, 199-205.

- Tang, B. L., Ong, Y. S., Huang, B., Wei, S., Wong, E. T., Qi, R., Horstmann, H. & Hong, W. (2001). A membrane protein enriched in ER exit sites interacts with COPII. *J Biol Chem* 6, 6.
- Tang, B. L., Peter, F., Krijnse-Locker, J., Low, S. H., Griffiths, G. & Hong, W. (1997). The mammalian homolog of yeast Sec13p is enriched in the intermediate compartment and is essential for protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *Mol Cell Biol* 17, 256-66.
- Terasaki, M. (1993). Probes for the Endoplasmic Reticulum. In *Fluorescent and luminescent probes for biological activity*, pp. 120 - 123. Edited by W. T. Mason. London: Academic Press.
- Terasaki, M. & Reese, T. S. (1992). Characterization of endoplasmic reticulum by co-localization of BiP and dicarbocyanine dyes. *J Cell Sci* 101, 315-22.
- Terasaki, M., Song, J., Wong, J. R., Weiss, M. J. & Chen, L. B. (1984). Localization of endoplasmic reticulum in living and glutaraldehyde- fixed cells with fluorescent dyes. *Cell* 38, 101-8.
- Teterina, N. L., Egger, D., Bienz, K., Brown, D. M., Semler, B. L. & Ehrenfeld, E. (2001). Requirements for assembly of poliovirus replication complexes and negative-strand RNA synthesis. *J Virol* 75, 3841-50.
- Teterina, N. L., Gorbalenya, A. E., Egger, D., Bienz, K. & Ehrenfeld, E. (1997). Poliovirus 2C protein determinants of membrane binding and rearrangements in mammalian cells. *J Virol* 71, 8962-72.
- Teterina, N. L., Kean, K. M., Gorbalenya, A. E., Agol, V. I. & Girard, M. (1992). Analysis of the functional significance of amino acid residues in the putative NTP-binding pattern of the poliovirus 2C protein. *J Gen Virol* 73, 1977-86.
- Towner, J. S., Mazanet, M. M. & Semler, B. L. (1998). Rescue of defective poliovirus RNA replication by 3AB-containing precursor polyproteins. *J Virol* 72, 7191-200.
- Tucker, S. P., Thornton, C. L., Wimmer, E. & Compans, R. W. (1993). Vectorial release of poliovirus from polarized human intestinal epithelial cells. *J Virol* 67, 4274-82.
- Vagner, S., Gensac, M. C., Maret, A., Bayard, F., Amalric, F., Prats, H. & Prats, A. C. (1995). Alternative translation of human fibroblast growth factor 2 mRNA occurs by internal entry of ribosomes. *Mol Cell Biol* 15, 35-44.
- Valnes, K. & Brandtzaeg, P. (1985). Retardation of immunofluorescence fading during microscopy. *J Histochem Cytochem* 33, 755-61.
- van der Voort, H. T. M. & Strasters, K. C. (1995). Restoration of confocal images for quantitative image analysis. *J Microsc* 178, 165-181.
- van Kuppeveld, F. J., Galama, J. M., Zoll, J., van den Hurk, P. J. & Melchers, W. J. (1996). Coxsackie B3 virus protein 2B contains cationic amphipathic helix that is required for viral RNA replication. *J Virol* 70, 3876-86.
- van Kuppeveld, F. J., Hoenderop, J. G., Smeets, R. L., Willems, P. H., Dijkman, H. B., Galama, J. M. & Melchers, W. J. (1997a). Coxsackievirus protein 2B modifies endoplasmic reticulum membrane and plasma membrane permeability and facilitates virus release. *Embo J* 16, 3519-32.
- Van kuppeveld, F. J., Melchers, W. J., Kirkegaard, K. & Doedens, J. R. (1997b). Structure-function analysis of coxsackie B3 virus protein 2B. *Virology* 227, 111-8.
- van Kuppeveld, F. J., van den Hurk, P. J., van der Vliet, W., Galama, J. M. & Melchers, W. J. (1997c). Chimeric coxsackie B3 virus genomes that express hybrid coxsackievirus- poliovirus 2B proteins: functional dissection of structural domains involved in RNA replication. *J Gen Virol* 78, 1833-40.
- Wacker, I., Kaether, C., Kromer, A., Migala, A., Almers, W. & Gerdes, H. H. (1997). Microtubule-dependent transport of secretory vesicles visualized in real time with a GFP-tagged secretory protein. *J Cell Sci* 110, 1453-63.
- Watzel, G., Bachofner, R. & Berger, E. G. (1991). Immunocytochemical localization of the Golgi apparatus using protein- specific antibodies to galactosyltransferase. *Eur J Cell Biol* 56, 451-8.

- Webb, R. H. & Dorey, C. K. (1995). The pixelated image. In *Handbook of biological confocal microscopy*. Edited by J. B. Pawley. New York: Plenum.
- Weber, S., Granzow, H., Weiland, F. & Marquardt, O. (1996). Intracellular membrane proliferation in *E. coli* induced by foot-and-mouth disease virus 3A gene products. *Virus Genes* 12, 5-14.
- Westrop, G. D., Wareham, K. A., Evans, D. M., Dunn, G., Minor, P. D., Magrath, D. I., Taffs, F., Marsden, S., Skinner, M. A., Schild, G. C. & et al. (1989). Genetic basis of attenuation of the Sabin type 3 oral poliovirus vaccine. *J Virol* 63, 1338-44.
- Whetter, L. E., Day, S. P., Brown, E. A., Elroy-Stein, O. & Lemon, S. M. (1994a). Analysis of hepatitis A virus translation in a T7 polymerase-expressing cell line. *Arch Virol Suppl* 9, 291-8.
- Whetter, L. E., Day, S. P., Elroy-Stein, O., Brown, E. A. & Lemon, S. M. (1994b). Low efficiency of the 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA in directing cap-independent translation in permissive monkey kidney cells. *J Virol* 68, 5253-63.
- Wimmer, E., Hellen, C. U. & Cao, X. (1993). Genetics of poliovirus. *Annu Rev Genet* 27, 353-436.
- Wimmer, E. & Nomoto, A. (1993). Molecular biology and cell-free synthesis of poliovirus. *Biologicals* 21, 349-56.
- Xu, D., Joglekar, A. P., Williams, A. L. & Hay, J. C. (2000). Subunit structure of a mammalian ER/Golgi SNARE complex. *J Biol Chem* 275, 39631-9.
- Yamanushi, T., Hirata, A., Oka, T. & Nakano, A. (1996). Characterization of yeast sar1 temperature-sensitive mutants, which are defective in protein transport from the endoplasmic reticulum. *J Biochem (Tokyo)* 120, 452-8.
- Zhang, J. X., Braakman, I., Matlack, K. E. & Helenius, A. (1997a). Quality control in the secretory pathway: the role of calreticulin, calnexin and BiP in the retention of glycoproteins with C-terminal truncations. *Mol Biol Cell* 8, 1943-54.
- Zhang, T., Wong, S. H., Tang, B. L., Xu, Y., Peter, F., Subramaniam, V. N. & Hong, W. (1997b). The mammalian protein (rbet1) homologous to yeast Bet1p is primarily associated with the pre-Golgi intermediate compartment and is involved in vesicular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *J Cell Biol* 139, 1157-68.
- Zuber, C., Roth, J., Misteli, T., Nakano, A. & Moremen, K. (1991). DS28-6, a temperature-sensitive mutant of Chinese hamster ovary cells, expresses key phenotypic changes associated with brefeldin A treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9818-22.

curriculum vitae

Name:	René Christian Rust
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Geburtsdatum:	31.03.1972
Geburtsort:	Princeton, New Jersey / USA
Werdegang:	
08/1978 bis 06/1982	Grundschule an der Jacobsallee / Essen
08/1982 bis 07/1991	Gymnasium Essen-Werden Abschluß: Abitur am 20.06.1991
09/1991 bis 11/ 1992	Zivildienst an der Ruhrlandklinik Essen
10/1992 bis 12/1997	Biologie-Studium an der Justus-Liebig-Universität Gießen
17.08.1995	Vordiplom in den Fächern Zoologie, Botanik, Chemie und Physik
19.12.1997	Abschluß der Diplomprüfungen in den Fächern Genetik, Zoologie, Molekularbiologie und Botanik
01/1998 bis 11/1998	Diplomarbeit am Biochemischen Institut des Klinikums der JLU Gießen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Beck. Titel: „Interaktion des eukaryotischen Initiationsfaktors eIF-4B mit der internen Ribosomen Eintritt-Stelle (IRES) des Maul- und Klauenseuche Virus.“
13.11.1998	Abschluß des Studiums als „Diplom Biologe“
11/1998 bis 12/1998	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Biochemischen Institut des Klinikums der JLU Gießen im Rahmen des SFB 535, „Invasionsmechanismen und Replikationsstrategien von Krankheitserregern“
seit 01/1999	Doktorand am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Basel, Arbeitsgruppe Virologie und Elektronenmikroskopie, Prof. Dr. K. Bienz

Publikationen

Rust, R. C., K. Ochs, K. Meyer, E. Beck, and M. Niepmann. 1999. Interaction of eukaryotic initiation factor eIF4B with the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus is independent of the polypyrimidine tract-binding protein. *J Virol.* 73: 6111-3

Ochs, K., **R. C. Rust**, and M. Niepmann. 1999. Translation initiation factor eIF4B interacts with a picornavirus internal ribosome entry site in both 48S and 80S initiation complexes independently of initiator AUG location. *J Virol.* 73: 7505-14

Landre, J. P., A. A. Gavriel, **R. C. Rust**, and A. J. Lamb. 2000. The response of *Aeromonas hydrophila* to oxidative stress induced by exposure to hydrogen peroxide. *J Appl Microbiol.* 89: 145-51

L. Saleh, **R. C. Rust**, R. Füllkrug, E. Beck, G. Bassili, K. Ochs and M. Niepmann. 2001. Functional interaction of translation initiation factor eIF4G with the foot-and-mouth disease virus internal ribosome entry site. *J Gen Virol.* 82 / 4: 757-63

Rust R. C., L. Landmann, R. Gosert, B. L. Tang, W. Hong, H.-P. Hauri, D. Egger, and K. Bienz. 2001. Cellular COPII proteins are involved in the production of vesicles forming the poliovirus replication complex. *J Virol.* 75 / 20: 9808-9818

Vorträge

„Strukturelle Voraussetzungen für die RNA-Replikation des Poliovirus.“

Seminar der Gottlieb-Daimler und Karl Benz Stiftung, 10.-12.09.1999, Willebadessen

„Poliovirus translation and formation of the replication complex occur at distinct sites in the host cell.“ INTAS Meeting, 19.-21.09.1999, Nijmegen, Niederlande

„Poliovirus bemächtigt sich zellulärer Vesikel zur Replikation seines Genoms.“ 22.06.2000, Anatomisches Institut der Universität Basel, Schweiz

„Formation of poliovirus-induced vesicles at ER membranes.“ INTAS Meeting, 09.-12.09.2000, Puschchino, Rußland

„Poliovirus hijacks cellular transport vesicles for the formation of its replication complex - 3D insights in the infected cell.“ 26.09.2000, Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Basel, Schweiz

„Poliovirus vesicles are formed at the ER by the cellular COPII mechanism - 3D insights into poliovirus-infected cells.“ 22.02.2001, Institut de Biologie Moleculaire des Plantes, Centre National de la Recherche Scientifique, Strasbourg, France

„Poliovirus vesicle formation occurs at the ER and is mediated by the cellular COPII mechanism“ 30.03.2001, 5th Regio Meeting on Virology, Freiburg

„Deconvolution, 3D-reconstruction, and surface-rendering of CLSM images to investigate the formation of poliovirus vesicles.“ CNRS-Training in Confocal Microscopy („Initiation a la Theorie de la Microscopie Confocale“), CNRS, Strasbourg 17. - 19. September 2001

„Poliovirus vesicles are formed at the ER by utilizing the cellular COPII mechanism - evidence by 3D microscopy.“, Swiss Virology PhD Meeting 2001, 24.-25.09. 2001, Gerzensee, Schweiz

Kongreßbeiträge

Ochs K., **R. C. Rust**, E. Beck und M. Niepmann „Funktionelle Interaktion des eukaryotischen Initiationsfaktors (eIF-)4B mit der Internen Ribosomen Eintritts-Stelle des Maul- und Klauenseuche-Virus (FMDV).“ Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie 1998, 02.-05.03. 1998, Regensburg

Rust R. C., K. Ochs , K. Meyer, E. Beck and M. Niepmann „Interaction of eucaryotic initiation factor eIF-4B and of polypyrimidine tract binding protein with the IRES of FMDV.“ Europic Conference, 05.-11.09.1998, Jena

Ochs K., **R. C. Rust**, E. Beck, and M. Niepmann „Direct interaction of eIF-4B with the FMDV IRES in ribosomal 48S and 80S initiations complexes.“ Europic Conference, 05.-11.09.1998, Jena

Ochs K., **R. C. Rust**, E. Beck und M. Niepmann „Funktionelle Interaktion des Polypyrimidin Binding Protein in Translationsinitiationskomplexen mit der internen Ribosomen-Eintritts-Stelle des Maul- und Klauenseuche-Virus.“ Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie 09.-12.03.1999, Bremen

Niepmann, M., K. Ochs, **R. C. Rust**, und E. Beck „Interaction of eIF4B and PTB with the IRES of FMDV in ribosomal initiation complexes.“ Conference Jaques Monod 1999 on „New Insights into the Mechanisms on mRNA Translation. The Significance of RNA Structure“, März 1999, Aussois, Frankreich

Ochs K., **R. C. Rust**, L. Saleh und M. Niepmann „Funktionelle Rolle der Domänen des Polypyrimidine Tract- Binding Protein (PTB) bei der Translation des Maul- und Klauenseuche Virus.“ Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie 2000, 26.-29.4.2000, Wien, Österreich

Rust R.C., D. Egger, R. Gosert, and K. Bienz „Formation of Poliovirus-induced vesicles occurs at ER-membranes concomitantly with a selective exclusion of membrane proteins.“ Europic Conference, 25.-31.05.2000, Baia delle Zagare (Mattinata), Italien

Gosert R., D. Egger, **R. C. Rust**, and K. Bienz „The replication of Hepatitis A virus (HAV) takes place at virus-induced membranes and is strictly compartmentalized.“ Europic Conference, 25-31.05.2000, Baia delle Zagare (Mattinata), Italien

Egger D., R. Gosert, **R. C. Rust**, and K. Bienz „Structural Investigations on RNA virus replication.“, APEM Conference, 26.-30.06.2000, Singapore

Lepori E., R. Gosert, D. Egger, **R. C. Rust**, K. Bienz „Limited viral RNA synthesis correlates with restricted virus-induced membrane alterations in hepatitis A virus-infected cells.“, 5th Regio Meeting on Virology, 30.03. 2001, Freiburg

Gosert, R., D. Egger, E. Lepori, **R. C. Rust**, and K. Bienz „The membrane-associated hepatitis A virus (HAV) RNA replication is restricted due to a limited viral membrane conversion capacity.“, 5th Regio Meeting on Virology, 30.03. 2001, Freiburg

L. Saleh, **R. C. Rust**, R. Füllkrug, E. Beck, G. Bassili, K. Ochs & M. Niepmann "The RNA-ribosome adaptor: interaction of initiation factor eIF4G with the internal ribosome entry site of foot-and-mouth-disease virus.", Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie 2001, 14.-17.03.2001, Dresden

L. Saleh, **R. C. Rust**, R. Füllkrug, E. Beck, G. Bassili, K. Ochs & M. Niepmann „The RNA-ribosome adaptor: interaction of initiation factor eIF4G with the internal ribosome entry site of foot-and-mouth-disease virus.“, 6th International Symposium on Positive Strand RNA Viruses, 28.05.-02.06.2001, Paris, Frankreich

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe. Die Stellen, die ich anderen Untersuchungen oder Veröffentlichungen dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen habe, sind durch entsprechende Quellenangaben gekennzeichnet.

Gießen im November 2001